

**Estudio del impacto de la  
estructura de la cromatina en la  
Respuesta a Daño en el ADN**

**Bárbara Martínez Pastor**  
**TESIS DOCTORAL**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**Facultad de Ciencias**  
**Departamento de Biología Molecular**  
**Madrid, 2010**



## ÍNDICE

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>1. Fuentes y tipos de daño en el ADN.....</b>	<b>7</b>
1.1 Daño endógeno .....	7
1.2 Daño exógeno.....	9
1.3 Daño en el ADN experimental .....	9
<b>2. La respuesta a daño en el ADN.....</b>	<b>10</b>
<b>3. Iniciación de la señal: PIKKs .....</b>	<b>11</b>
3.1 DNA-PKcs .....	12
3.2 ATM.....	13
3.3 ATR.....	14
<b>4. Amplificación de la señal .....</b>	<b>15</b>
<b>5. Efectos de la DDR .....</b>	<b>17</b>
5.1 Reparación.....	18
5.2 Parada del ciclo celular .....	19
5.3 Senescencia .....	21
5.4 Apoptosis .....	22
5.5 Diferenciación.....	23
<b>6. Dinámica de la cromatina .....</b>	<b>24</b>
6.1 Organización del material genético en forma de cromatina.....	24
6.2 Mecanismos de regulación de la compactación de la cromatina.....	25
6.3 Relación entre la estructura cromatina y DDR .....	27
<b>7. L3MBTL1: la proteína compactadora de la cromatina .....</b>	<b>30</b>
7.1 Función compactadora .....	30
7.2 Función transcripcional .....	32
7.3 L3MBTL1 como posible gen supresor de tumores .....	33
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
<b>1. Cultivos celulares.....</b>	<b>41</b>

1.1	Líneas celulares.....	41
1.2	Infecciones adenovirales y retrovirales .....	42
1.3	Análisis del ciclo celular .....	43
1.4	Curvas de crecimiento (protocolo 3T3) .....	43
1.5	Purificación y cultivo de linfocitos B primarios de ratón .....	44
<b>2.</b>	<b>Generación del modelo murino de pérdida condicional de función de L3MBTL1</b>	<b>44</b>
<b>3.</b>	<b>Mantenimiento y genotipaje de los ratones .....</b>	<b>45</b>
<b>4.</b>	<b>Análisis de ADN .....</b>	<b>46</b>
4.1	Extracción de ADN .....	46
4.2	PCR .....	46
4.3	<i>Southern Blot</i> .....	47
4.4	Ensayo de cometa.....	48
<b>5.</b>	<b>Análisis de ARN .....</b>	<b>48</b>
5.1	Extracción de ARN .....	48
5.2	Micromatrices de ADN ( <i>microarrays</i> ) .....	48
5.3	RT-PCR cuantitativa .....	49
<b>6.</b>	<b>Análisis de proteínas .....</b>	<b>49</b>
6.1	Extracción de proteínas y <i>Western blot</i> .....	49
6.2	Aislamiento y visualización de las proteínas unidas a la cromatina ( <i>chromatin bound fractionation</i> ) .....	50
6.3	Inmunofluorescencia convencional.....	50
6.4	Inmunofluorescencia de alto rendimiento .....	51
6.5	Análisis de la dinámica de proteínas por FRAP (recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo) .....	52
6.6	Citometría de flujo de los eventos fosforilados por daño en el ADN .....	52
6.7	Anticuerpos empleados .....	53
<b>7.</b>	<b>Análisis de la DDR.....</b>	<b>53</b>
7.1	Ensayo de supervivencia de colonias.....	53
7.2	Análisis de <i>checkpoints</i> .....	53
7.3	Generación de DSB de forma localizada con láser UV .....	54
<b>8.</b>	<b>Análisis de linfocitos B primarios .....</b>	<b>54</b>
8.1	Análisis de proliferación .....	54
8.2	Análisis de class switch recombination .....	55

## RESULTADOS..... 59

### 1. ATM regula la carga de ATR en la cromatina en respuesta a rupturas de doble cadena en el ADN generadas por radiación ionizante ..... 59

- 1.1 La fosforilación de Chk1 inducida por radiación ionizante depende de ATM y ATR... 59
- 1.2 La fosforilación de Chk1 y Chk2 en respuesta a daño en el ADN es específica de la fase del ciclo celular ..... 62
- 1.3 ATM regula la carga de ATR en la cromatina en respuesta a DSB..... 63
- 1.4 Un nuevo modelo para las funciones de ATM/ATR/Chk1 en DSB..... 66

### 2. La compactación global de la cromatina limita la magnitud de la respuesta al daño en el ADN..... 69

- 2.1 La deficiencia en H1 en células de mamíferos promueve una estructura abierta de la cromatina..... 69
- 2.2 Las células H1<sup>50</sup> muestran una mayor resistencia a genotoxicidad..... 69
- 2.3 Las células H1<sup>50</sup> muestran *checkpoints* hipersensibles..... 71
- 2.4 Las células H1<sup>50</sup> activan una mayor DDR ..... 72
- 2.5 Una cromatina abierta posibilita una mayor señalización de cada DSB ..... 74
- 2.6 Niveles bajos de H1 facilitan el acceso de las proteínas de la DDR a las rupturas ..... 77
- 2.7 Niveles bajos de H1 estimulan de la reparación por HR..... 78
- 2.8 La bajada de H1 no afecta de forma importante a la transcripción génica ..... 78
- 2.9 ¿Puede la compactación de la cromatina explicar la variabilidad de la DDR en una población celular?..... 80

### 3. Desarrollo de un modelo animal de cromatina abierta ..... 83

- 3.1 La ausencia de L3MBTL1 provoca alteraciones mitóticas ..... 83
- 3.2 L3MBTL1 se encuentra unida a la cromatina, con una afinidad máxima al final de anafase..... 86
- 3.3 L3MBTL1 no se recluta a los DSB..... 87
- 3.4 L3MBTL1 regula la expresión de un set de genes..... 89
- 3.5 Los TSS de los genes regulados por L3MBTL1 están enriquecidos en H4K20me1 ..... 91
- 3.6 Descripción del constructo ..... 93
- 3.7 Generación del modelo ..... 93
- 3.8 Eliminación de L3MBTL1 en el ratón ..... 94
- 3.9 Eliminación de L3MBTL1 en células embrionarias murinas ..... 96
- 3.10 Eliminación de L3MBTL1 en linfocitos B ..... 99

## DISCUSIÓN .....107

<b>1. Relación entre ATM y ATR .....</b>	<b>107</b>
1.1 Necesidad de un nuevo modelo para la respuesta a daño en el ADN inducido por radiación ionizante .....	107
1.2 ATM controla la activación de ATR en células irradiadas .....	108
1.3 Cuestiones sin resolver en la señalización del daño por ATM y ATR.....	109
<b>2. Papel de la compactación de la cromatina en la DDR.....</b>	<b>112</b>
2.1 Las células no responden con igual intensidad ante el daño generado en su ADN. .	112
2.2 La compactación de la cromatina limita la señalización de los DSB.....	113
2.3 El efecto cromATRina.....	114
2.4 Mayor accesibilidad de la cromatina en respuesta a DSB.....	114
<b>3. Desarrollo de sistemas para demostrar <i>in vivo</i> el papel de la compactación de la cromatina .....</b>	<b>115</b>
3.1 Elección de L3MBTL1 para estudiar la compactación de la cromatina <i>in vivo</i> .....	115
3.2 L3MBTL1 es un regulador de la transcripción .....	117
3.3 Importancia de L3MBTL1 en ciclo celular .....	118
3.4 L3MBTL1 como gen supresor tumoral.....	120
3.5 L3MBTL1: ¿compactador global o local? .....	121
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>127</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>131</b>
<b>ANEXO-PUBLICACIONES.....</b>	<b>143</b>

## ABSTRACT

DNA is the only biological molecule that relies on repair of existing molecules, without any remanufacture. But in the organism, DNA, as any other biomolecule, is constantly under insults that result from endogenous (cellular metabolic processes) or exogenous sources (environmental factors). To avoid the accumulation of DNA damage and ensure survival and propagation of accurate copies of the genome to subsequent generations, eukaryotic cells respond to DNA damage with a multifaceted response: the DNA damage response (DDR).

ATM and ATR are two kinases that are key to initiate the signaling of the DDR. At the beginning of this thesis, ATM and ATR were thought to coordinate two separate and alternative molecular routes in the *checkpoint* responses: ATM would signal DSB in any phase of the cell cycle through its downstream kinase Chk2, whereas ATR would only be activated by replicative damage and lead to checkpoint activation in a Chk1 kinase-dependent manner. Analyzing the requirements of these four kinases in the response to DSB produced by ionizing radiation we discovered that, in this context, both molecular routes are connected. The crosstalk between ATM and ATR occurs at the level of ATR loading on the damaged chromatin, a process that is controlled by ATM in response to ionizing radiation. This initial study attracted our research to the role that chromatin plays in the assembly of the DDR. In particular, we decided to explore how the preexisting chromatin configuration could affect the DDR. In this regard, we first discovered that cells with a more “open chromatin” have an enhanced signaling per break that leads to a more robust DDR and higher resistance to genotoxic agents. Specifically, lower levels of the linker histone H1 lead to a more robust ATR-Chk1 pathway, which stimulates Homologous Recombination (HR) mediated repair and longer telomeres. These results prompted us to explore whether we could modulate chromatin accessibility *in vivo*, in a mammalian model. With this in mind, we generated a mouse model deficient in L3MBTL1, a protein that was previously shown to promote chromatin compaction by bridging distant nucleosomes. Moreover, L3MBTL1 presented a number of features that made it attractive beyond its potential impact on the DDR, such as being a tumour suppressor in *Drosophila*, regulating the E2F/Rb and myc transcriptional pathways, or its interaction with HP1 proteins. Our initial data suggest that L3MBTL1 might modulate chromatin accessibility and recombination at specific *loci*, rather than in a general manner. These and other results about the early characterization of these animals are discussed.





## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	ATM and Rad3 Related
BSA	Albúmina de suero bovino
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
Células ES	Células madre embrionarias (embryonic stem cells o ES cells)
Chk1	Checkpoint kinase 1
Chk2	Checkpoint kinase 2
CSR	Recombinación de cambio de clase de inmunoglobulinas
Cy3	Indocarbocyanina
Cy5	Indodicarbocianina
DDR	Respuesta al daño en el ADN ( <i>DNA damage response</i> )
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSB	Rupturas de doble cadena ( <i>double strand breaks</i> )
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
Células ES	Células madre embrionarias
FBS	Suero fetal bovino
Gy	Gray
H2AX	Histona H2A variante X
$\gamma$ -H2AX	Forma fosforilada de la histona H2AX en la serina 139
H3K9me3	Histona 3 trimetilada en su lisina 9
H3S10P	Histona 3 fosforilada en su serina 10
H4K20me1	Histona 4 monometilada en su lisina 20
HP1 $\gamma$	Heterochromatin Protein 1 $\gamma$
HR	Recombinación homóloga
HTM	Microscopía de alto rendimiento ( <i>high throughput microscopy</i> )
HU	Hidroxiurea
Ig	Inmunoglobulina
RI	Radiación ionizante
IRIF	Focos inducidos por radiación ionizante
KI	<i>Knock-in</i>
KO	<i>Knock-out</i>
MMS	Metil metano sulfonato

## ABREVIATURAS

NCS	Neocarcinostatina
NHEJ	Unión de extremos no homólogos
OIS	Senescencia inducida por oncogenes
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RI	Radiación ionizante
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RPA	Replication protein A
SAHF	Focos de heterocromatina asociados a senescencia
SDS	Dodecil sulfato sódico
ssDNA	ADN de cadena sencilla
Tg	Transgénico
TSA	Tricostatina A
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
UV	Radiación ultravioleta
WB	Western Blot
WM	Wortmanina
Wt	Wild type
4-OHT	4-hidroxi-tamoxifeno

# INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

El daño en el ADN tiene efectos muy nocivos para las células, e incluso para el organismo. Por un lado, las mutaciones en la secuencia de ADN pueden alterar la función de genes críticos para el control del ciclo celular y derivar en cáncer. Pero, además de este efecto bien conocido, el daño en el ADN se ve involucrado en muchos otros casos tales como en inmunodeficiencias, procesos neurodegenerativos o esterilidad. Finalmente, datos recientes también ponen de manifiesto que la acumulación de daño en el ADN, particularmente en las células madre, es responsable de la pérdida de las capacidades regenerativas de los diferentes tejidos, y por lo tanto el último responsable del proceso de envejecimiento. Por desgracia, el ADN no está exento de daño y son muchas las causas que pueden derivar en lesiones en el genoma.

### 1. Fuentes y tipos de daño en el ADN

Existen diferentes fuentes de generación de daño en el ADN. Una de ellas es la propia replicación del ADN, un proceso extremadamente crítico ya que requiere la duplicación exacta de su secuencia e implica procesos complejos como el desenrollamiento de la molécula y su posterior ensamblaje. Otra fuente de daño son los cambios espontáneos que sufren los nucleótidos de la cadena de ADN. Sin que exista un ataque por agentes mutagénicos, éstos a menudo alteran las bases del ADN y por tanto la información contenida en la secuencia. Por último, las moléculas de ADN pueden ser atacadas por agentes mutagénicos como moléculas generadas por el metabolismo celular o agentes exógenos como especies químicas y mutágenos físicos.

#### 1.1 Daño endógeno

##### **Daño producido durante la replicación**

La replicación del ADN por las polimerasas durante la fase S del ciclo está sujeta a un bajo, pero no insignificante, nivel de error. Entre estos errores, se encuentran los generados por la incorporación a la cadena de ADN de nucleótidos alterados químicamente o la incorporación errónea de un nucleótido en lugar de otro. Existen mecanismos durante la replicación que vigilan y corrigen estos errores: la lectura de prueba o *proofreading* y el *mismatch repair*. Otra amenaza reside en el hecho de que para duplicar el ADN, las horquillas de replicación han de abrir temporalmente la doble hebra exponiendo pequeñas secciones de cadena simple. Cualquier obstáculo que cause un bloqueo de la maquinaria replicativa mientras el ADN es desenrollado provoca que las horquillas se abran excesivamente y que largos fragmentos de cadena simple se expongan. Estas largas regiones de cadena simple son altamente recombinogénicas y son

interpretadas por la célula como una alteración de la estructura natural del ADN. Por otra parte, la pérdida de procesividad de algunos de los componentes de la maquinaria puede generar tensión en la horquilla de replicación que desembocaría en la ruptura del ADN. En último lugar, la acción de las topoisomerasas también puede generar lesiones en el ADN. Las topoisomerasas I y II son enzimas capaces de liberar la tensión provocada por el superenrollamiento que aparece delante de la horquilla durante la replicación. Actúan cortando y ligando una o las dos hebras, proceso que se convierte en una fuente potencial de rupturas si su acción ligadora se bloquea (D'Arpa et al. 1990).

### **Daño procedente del metabolismo**

De forma fisiológica, el genoma está continuamente atacado por procesos bioquímicos espontáneos. La estructura de doble hélice del ADN, con las bases colocadas hacia el interior, protege a los grupos químicos reactivos de la molécula (como los grupos amino de las bases) del daño químico actuando como escudo. A pesar de su estructura, las moléculas de ADN son objeto de alteraciones químicas y daño físico. Algunas de estas acciones están provocadas por la acción del hidrógeno y de los iones hidroxilo que están presentes a baja concentración a pH neutro. De forma espontánea se puede producir depurinación (ocurre  $10^{17}$  veces en el cuerpo humano cada día), depirimidinación y desaminación de las bases (Lindahl 1993). Pero el ambiente intracelular ofrece otros peligros para la integridad del ADN. El mayor de éstos es la oxidación, que de largo produce más daño que cualquiera de los procesos anteriores. Las reacciones que tienen lugar en la mitocondria generan, a medida que se va reduciendo el oxígeno a agua, una serie de intermediarios muy reactivos. Se trata de las especies reactivas del oxígeno (ROS): ion superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (De Bont et al. 2004). Estas especies pueden salir de la mitocondria y oxidar las bases del ADN. Como consecuencia, se generan rupturas de cadena simple (*single strand DNA*, ssDNA), rupturas de doble cadena en el ADN (*double strand breaks* o DSB) y se pueden producir pérdidas de bases o uniones covalentes ADN-proteína.

### **Daño programado**

A pesar de su potencial toxicidad, la evolución ha seleccionado procesos de diferenciación y desarrollo que utilizan DSB como productos intermedios de sus reacciones de recombinación. Así se generan DSB para posibilitar la recombinación entre cromosomas homólogos durante la meiosis o como intermediarios durante los procesos de recombinación somática (o V(D)J) y de recombinación del cambio de clase de inmunoglobulinas (*Class-switch recombination* o CSR) en linfocitos. En el comienzo de meiosis, cada cromosoma reconoce a su homólogo y se colocan alineados uno al lado del otro en toda su longitud. Esta disposición permite el intercambio de ADN entre secuencias homólogas y así se aumenta la diversidad genética de los gametos. Durante los procesos de V(D)J y CSR se introducen rupturas de forma controlada por la célula en regiones específicas del genoma de linfocitos. El proceso V(D)J implica la recombinación entre diferentes

secuencias llamadas V, D y J presentes en los *locus* de receptores de antígenos, para generar una combinación específica entre ellas que incrementa la variedad de receptores de linfocitos T y de anticuerpos. El proceso de CSR consiste en la recombinación entre dos regiones específicas en el *locus* IgH que sustituirá la región constante de la inmunoglobulina IgM por otra región constante para producir anticuerpos con diferentes funciones efectoras (IgG, IgA e IgE).

## 1.2 Daño exógeno

Por último, por interacción con el ambiente, el genoma está bajo el ataque ocasional de mutágenos exógenos y sus metabolitos. Entre estos agentes se encuentran los rayos X y los rayos gamma ( $\gamma$ ) (Hoeijmakers 2001), ondas electromagnéticas que al incidir sobre las moléculas de agua de la célula liberan electrones libres. Los radicales libres pueden provocar rupturas de cadena simple y de doble cadena en el ADN además de generar ROS. Otro tipo de radiación, aunque con mucho menor poder de ionización es la radiación ultravioleta (UV) del sol. Aunque la capa de ozono escude la mayor parte del UV que incide sobre la tierra, se trata de la mayor fuente de radiación de la que tiene que protegerse el organismo. Cuando la luz UV penetra e incide sobre una molécula de ADN en una célula de nuestra piel, el resultado suele ser la formación de dímeros de pirimidina (enlaces covalentes) entre dos pirimidinas adyacentes en la misma cadena de ADN (Jiang et al. 2009). Estos dímeros son muy estables y pueden persistir durante largo tiempo en el ADN si no son reconocidos y eliminados por enzimas de reparación del ADN.

Además, una gran variedad de especies químicas pueden entrar en nuestro organismo y reaccionar con el ADN. Muchas de estas especies químicas son electrofílicas, es decir, son moléculas que reaccionan con regiones ricas en electrones de sus moléculas diana. Entre los más potentes mutagénicos se encuentran los agentes alquilantes que pueden añadir grupos alquilo covalentemente a las bases del ADN. Esto hace que se desestabilice y se rompa finalmente el enlace entre la base y la desoxirribosa provocando la pérdida de una base en el ADN. De forma alternativa, si el enlace no se rompe, esta base puede ser leída de forma incorrecta por la ADN polimerasa. Además, algunos compuestos, en principio inertes, son convertidos por el metabolismo celular en carcinógenos extremadamente reactivos con el ADN y por tanto muy mutagénicos. Normalmente, el metabolito resultante logra formar enlaces covalentes entre bases generando unas estructuras llamadas aductos de ADN.

## 1.3 Daño en el ADN experimental

En el laboratorio se hace uso de diversas formas de daño para el estudio de las rutas implicadas en la respuesta a daño en el ADN. Por un lado, las radiaciones ionizantes como los

rayos  $\gamma$  y compuestos radiomiméticos como la neocarzinostatina (NCS) permiten generar DSB tanto en células en cultivo como en animales. La hidroxiaurea (HU), la afidicolina y otros compuestos utilizados en quimioterapia sirven para generar estrés replicativo y rupturas en las células que están sintetizando ADN. Cada uno de estos agentes perturba la replicación por un flanco distinto, provocando lesiones de distinta naturaleza y toxicidad. Son de uso común además la doxorubicina (intercalante), el etopósido (inhibidor de la topoisomerasa II), la camptotecina (inhibidor de la topoisomerasa I) y el metil-metano-sulfonato (MMS, alquilante del ADN).

## 2. La respuesta a daño en el ADN

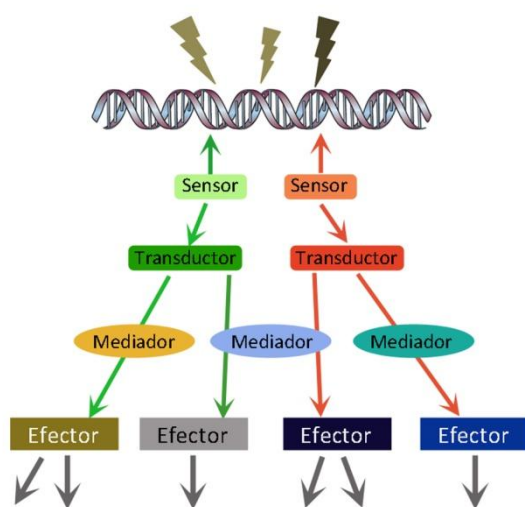
De todas las formas de daño, los DSB y la acumulación de ssDNA por su potencial recombinogénico, son las más nocivas. En su presencia, la célula desencadena una respuesta coordinada, la respuesta a daño en el ADN (*DNA damage response* o DDR), cuyo principal objetivo es la reparación del daño y el mantenimiento de la integridad genómica (Harper et al. 2007). La maquinaria de la DDR detecta la lesión y pone en marcha mecanismos de reparación. Dependiendo de la naturaleza y de la gravedad de las lesiones, la DDR, además de activar la reparación, puede detener el ciclo celular, activar programas de transcripción e incluso desencadenar la muerte celular programada de la célula (apoptosis) o la senescencia. La inmensa mayoría de pequeñas lesiones, como las modificaciones puntuales de las bases que se producen constantemente, son reparadas sin ningún trastorno para la célula. No obstante, los DSB son las lesiones estructurales que desafían más gravemente la integridad del ADN y pueden disparar una señal que implicará la parada del ciclo celular por activación de los puntos de control del ciclo celular (o *checkpoints*). Este tipo de rupturas se pueden producir como consecuencia final de la tensión en las horquillas de replicación o como el resultado del procesamiento de rupturas monocatenarias, pero también, como ya hemos explicado, de forma fisiológica en el proceso de recombinación meiótica y en los procesos de recombinación V(D)J y de *class switch recombination* durante la maduración de linfocitos.

Sin una respuesta apropiada frente a los DSB, se podrían producir translocaciones y fusiones cromosómicas que impedirían una correcta segregación de los cromosomas durante la mitosis e incluso pérdidas de fragmentos cromosómicos en las subsecuentes divisiones. Cualquiera de estas consecuencias podría actuar de evento iniciador de una transformación celular por pérdida de un gen supresor de tumores o por la activación de un oncogén al ser translocado bajo otro promotor.

Molecularmente, la respuesta a daño en el ADN es mediada por un sistema de señalización jerárquico y altamente diversificado capaz de activar de forma específica y ordenada diferentes grupos de proteínas para llevar a cabo cada una de las tareas requerida por la célula (Shiloh 2003).



En primer lugar, la lesión es detectada por unas proteínas “sensores” que reconocen la lesión o las alteraciones de la cromatina que siguen a la ruptura del ADN. Seguidamente, los extremos de la ruptura que han quedado libres muchas veces son procesados ya que al tener una estructura aleatoria no sirven de sustrato para los mecanismos de reparación. Después, los sensores reclutan a los “transductores” de la señal que se activan y transmiten la señal a los “efectores”. En este paso se produce la amplificación de la señal ya que un solo transductor, a través de proteínas mediadoras y adaptadoras, puede activar un gran número de efectores implicados en rutas de señalización diferentes. Los mediadores y adaptadores hacen posible que la señal emitida desde la lesión sea transmitida a todo el núcleo. Los efectores serán finalmente las proteínas encargadas de ejecutar las tareas que requiere la DDR (figura 1).



**Figura 1: Estructura de la respuesta a daño en el ADN.** Las diferentes lesiones son reconocidas por sensores específicos que reclutan a los transductores para emitir la señal. Con la ayuda de mediadores esta señal es amplificada y transformada hasta alcanzar a los efectores que ejecutan las acciones necesarias.

### 3. Iniciación de la señal: PIKKs

Existen diferentes complejos enzimáticos de transducción de la señal que se movilizan inmediatamente en respuesta a daño en el ADN. Los más significativos y estudiados son las quinasas ATM (Ataxia-Telangiestasia Mutated), ATR (ATM and Rad3 Related) y DNA-PKcs (DNA Protein Kinase catalytic subunit) (Su 2006). Las tres transmiten el mensaje por la vía más clásica de señalización: la fosforilación de proteínas. Existen otras cascadas de modificación postraduccionales en la DDR, fundamentales para expandir y modular la señal, como la ubiquitinación, la acetilación y la sumoilación (Van Attikum et al. 2009). Esta creciente complejidad permite la elaboración de una señal molecular más precisa y más regulable proporcionando un mejor control sobre cada una de las funciones de la respuesta al daño y sobre la toma de decisiones por parte de la célula. La transmisión de la señal es posible gracias a que las modificaciones postraduccionales activan complejos enzimáticos presentes aunque inactivos y

promueven interacciones proteína-proteína previamente inexistentes, generándose así una cascada creciente de activaciones. Además de promover la actividad enzimática, estas modificaciones postraduccionales tienen otras funciones reguladoras como controlar la estabilidad de la proteína o modular interacciones proteína-ADN.

ATM, ATR y DNA-PKcs pertenecen, junto a mTOR, SMG1 y TRRAP, a la familia de las PIKKs o *PI-3-kinase-related-kinases*, por su homología con la fosfatidilinositol-3-quinasa (*phosphatidylinositol-3-kinase* o PI3K) (Shiloh 2003). A diferencia de ésta, responsable de la fosforilación de lípidos implicados en señalización de membrana, ATM, ATR y DNA-PKcs fosforilan proteínas, específicamente en residuos serina y treonina preferencialmente seguidos por un glutámico (sitios [S/T]Q). Son proteínas de pesos moleculares inusualmente altos (entre 300 y 500 kDa) en las que el dominio quinasa está altamente conservado. A pesar de su gran tamaño, este dominio supone únicamente el 5-10% del total de la proteína, lo que revela que gran parte de la cadena polipeptídica tiene estrictamente funciones reguladoras. Estas proteínas comparten una distribución estructural similar, caracterizada por una larga región amino-terminal repleta de repeticiones HEAT (nombre derivado de *Huntingtin*, *Elongation factor 3*, *a subunit of protein phosphatase 2A*, and *TORI*), y una región carboxi-terminal compuesta por los dominios FATC (*FAT C-terminal*), quinasa (dominio catalítico PI3K), PRD (*PIKK Regulatory Domain*) y FAT (*FRAP*, *ATM* and *TRRAP*) (Lovejoy et al. 2009).

ATM y DNA-PKcs se activan en respuesta a rupturas de doble cadena en todas las fases del ciclo celular (Gottlieb et al. 1993; Pandita et al. 2000). Por otro lado, ATR es la responsable de señalar la aparición de ADN de cadena sencilla (*ssDNA*), y su actividad está restringida a las fases S y G2 (Zou and Elledge 2003). En condiciones normales, la actividad de DNA-PKcs está restringida a la zona de la lesión y promueve fundamentalmente la reparación de los DSB (Collis et al. 2005), mientras que ATM y ATR tienen un papel esencial en la señalización global del daño, y son capaces de fosforilar *in vivo* a más de 700 sustratos conocidos de la respuesta a daño en el ADN (Matsuoka et al. 2007).

### 3.1 DNA-PKcs

DNA-PKcs es atraída a la lesión por el sensor de daño Ku70/Ku80. Una vez en la lesión, DNA-PKcs se autofosforila en varios residuos que parecen contribuir a su activación (Chan et al. 2002) provocando un cambio conformacional que facilita que los demás factores necesarios para la ligación tengan acceso a los extremos de ADN (Cui et al. 2005; Reddy et al. 2004; Uematsu et al. 2007). Aunque DNA-PKcs funciona como quinasa solo localmente en la ruptura, puede fosforilar sustratos comunes a ATM y ATR, como H2AX, aumentando la capacidad de señalización y atrayendo a otros mediadores a la lesión (Stiff et al. 2004). La ausencia de actividad DNA-PKcs en

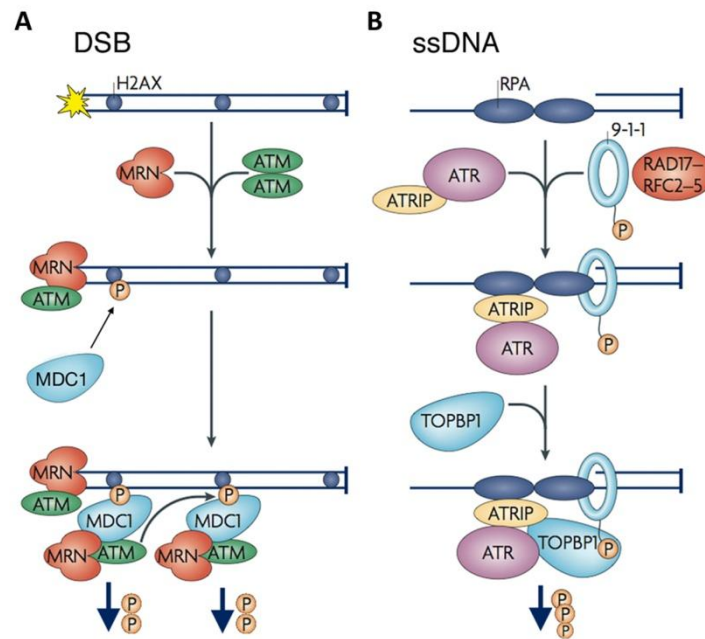
ratón resulta en un defecto profundo del sistema inmune (denominado *Severe Combined immunodeficiency*, SCID) que se acompaña de una hipersensibilidad a radiación ionizante (Smith et al. 1999). Además, DNA-PKcs es indispensable para el desarrollo embrionario en ausencia de ATM (Gurley et al. 2001) y un reciente trabajo muestra que, en linfocitos, DNA-PKcs es necesaria para complementar funciones que en condiciones normales son llevadas a cabo inicialmente por ATM (Callén et al. 2009). A pesar de la redundancia funcional a nivel molecular, DNA-PKcs no puede suplir todas las funciones de ATM, debido a que la diferencia entre las dos quinasas reside en la importancia de ATM para el establecimiento de los *checkpoints*.

### 3.2 ATM

La proteína ATM se identificó como el producto del gen que se encuentra mutado, ya sea perdido o inactivado, en la enfermedad genética humana ataxia-telangiectasia (A-T) (Savitsky et al. 1995). La enfermedad forma parte de los síndromes de inestabilidad genómica y los pacientes presentan los síntomas característicos de una reparación deficiente de las rupturas de doble cadena en el ADN: inmunodeficiencia, inestabilidad genómica, atrofia de timo y gónadas, predisposición a tumores de origen linfóide e hipersensibilidad a la radiación ionizante, además de presentar neurodegeneración; otro síntoma de causa desconocida pero común en los síndromes de inestabilidad genómica (Shiloh et al. 2001).

La respuesta mediada por ATM es iniciada por el complejo mediador Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) que actúa como sensor de los DSB para ATM (Lee et al. 2004; Lee et al. 2005; Petrini et al. 2003; Uziel et al. 2003). El mecanismo por el cual los componentes del complejo MRN activan a ATM no se ha establecido, sin embargo se sabe que mutaciones en Nbs1 y en Mre11 provocan síndromes similares a A-T (Kobayashi et al. 2004; Stewart et al. 1999). El modelo actual propone que cuando se produce un DSB, Nbs1 es capaz de interaccionar con ATM a través de su extremo C-terminal (You et al. 2005) y atraerla a los DSB inmediatamente después del daño, gracias a que ATM está en contacto activo con la cromatina (Kim et al. 2009). Aunque Nbs1 puede ser fosforilado por ATM, en este caso acude a los DSB de forma independiente (Celeste et al. 2003) por lo que se le considera el evento iniciador de la señal. Mre11 y su interacción con Nbs1 a través del mismo extremo C terminal son también necesarios para activar ATM en las rupturas (Carson et al. 2003; Horejsi et al. 2004). Una vez en la ruptura, ATM se activa catalíticamente al pasar de un estado dimerico a uno monomérico, lo que expone su dominio quinasa (figura 2). En células humanas se cree que este proceso es consecuencia de una serie de autofosforilaciones (Bakkenist et al. 2003; Kozlov et al. 2006). Sin embargo, otros trabajos afirman que estos sitios conocidos de autofosforilación son irrelevantes para la actividad catalítica de ATM *in vivo* siendo una consecuencia y no una causa de su activación (Daniel et al. 2008; Pellegrini et al. 2006). La

posterior fosforilación de Nbs1 aumenta la afinidad del complejo por la zona de la ruptura (Lukas et al. 2003), lo que contribuye a la expansión de la señal.



**Figura 2: Mecanismo de activación de ATM y ATR.** (A) ATM acude a los DSBs con el complejo MRN. La fosforilación de H2AX y el reclutamiento de MDC1 amplifica la señal de actividad de ATM. (B) ATR es reclutada por RPA a los segmentos de ssDNA, activándose al interactuar con TopBP1 (Adaptado de Cimprich and Cortez, 2008).

### 3.3 ATR

El estudio de las quinasas de la DDR ha estado históricamente centrado en ATM, en parte por su mayor implicación en síndromes humanos conocidos y en parte por la dificultad que ha existido hasta ahora para trabajar con modelos biológicos deficientes en ATR. ATR responde a cadenas de ADN monocatenario (ssDNA) anormalmente largas. Éstas pueden aparecer como consecuencia de la descoordinación entre la maquinaria de replicación y el desenrollamiento en el avance de las horquillas durante la fase S. De esta forma, cuando las horquillas de replicación se bloquean en respuesta a alteraciones en el ADN, la actividad de ATR mantiene la estabilidad de los complejos replicativos necesaria para reanudar correctamente la síntesis de ADN (Paulsen et al. 2007).

ATR sólo existe como parte de un complejo heterodimérico con ATRIP (ATR Interacting Protein) que es necesaria para su actividad señalizadora y responsable de la correcta relocalización de ATR a los sitios de ssDNA (Cortez et al. 2001; Zou et al. 2003). Para ser activo, el complejo ATR-ATRIP necesita, además, interactuar con la proteína TopBP1 que funciona como un inductor alostérico directo del dominio quinasa de ATR (Kumagai et al. 2006). El complejo funciona de la manera siguiente: mientras que ATR y ATRIP coexisten indivisiblemente como

complejo, solo interaccionan con TopBP1 cuando los tres componentes son reclutados a las zonas de ssDNA, disparando entonces la actividad quinasas de ATR. Este mecanismo de control por colocalización funciona gracias a que diferentes sensores son responsables de reclutar a ATR-ATRIP y TopBP1 al ssDNA. La proteína de replicación A (*Replication Protein A* o RPA) recubre el ADN de cadena sencilla y atrae por un lado a ATR-ATRIP (Walter et al. 2000) y por otro lado a Rad17. Rad17 interacciona con el factor de replicación C (RFC) y carga al complejo 9-1-1 (Rad9, Hus1 y Rad1) (Bermudez et al. 2003; Medhurst et al. 2008) en el ADN de doble cadena adyacente a ssDNA recubierto por RPA (Majka et al. 2006; Zou et al. 2003). Es Rad9 quién pone en contacto a ATR-ATRIP y a TopBP1 al interaccionar con RPA y reclutar a TopBP1 (figura 2). Además de requerir todos estos factores para activarse genéricamente, ATR necesita un adaptador específico llamado Claspin para fosforilar a uno de sus sustratos fundamentales: Chk1. Además de la actividad de ATR, los niveles de Claspin están estrictamente regulados en función de la fase del ciclo, de esta forma la activación de Chk1 está restringida a S y G2 por ambos mecanismos (Mailand et al. 2006).

Una mutación en ATR es responsable de la enfermedad de Seckel (Griffith et al. 2008; O'Driscoll et al. 2004; O'Driscoll et al. 2003), de la que existen muy pocos casos registrados. Los pacientes presentan una mutación puntual en el exón 9 del gen de ATR, que aunque es silenciosa, altera el *splicing* normal del ARN mensajero generando mayoritariamente una proteína truncada y no funcional, de forma que los pacientes solo tienen un 5% de los niveles normales de ATR. Esta deficiencia en ATR provoca un retraso grave en el desarrollo (o *dwarfismo*), envejecimiento prematuro, inestabilidad genómica y neurodegeneración. Aunque ATM y ATR tienen una función muy parecida, las consecuencias de la falta de ATM o ATR a nivel celular y a nivel del organismo son dramáticamente diferentes: la pérdida de ATR causa la letalidad en el primer estado embrionario (Brown et al. 2000) mientras que los individuos que carecen de ATM funcional pueden vivir décadas. Este hecho ha significado una enorme limitación técnica en el estudio de su función a nivel molecular y de su relevancia en la respuesta al daño. Sin embargo, la investigación llevada a cabo en los últimos años ha aportado un amplio conocimiento al mecanismo de acción de ATR, dilucidando su papel global y esencial en la supervisión de la replicación. El modelo murino humanizado del síndrome de Seckel desarrollado en nuestro laboratorio ha permitido revelar cómo el estrés replicativo que se produce durante el desarrollo intrauterino, debido a bajos niveles de ATR, es la causa de un fenotipo tan severo (Murga et al. 2009).

## 4. Amplificación de la señal

Para propagar la señal de alerta y orquestar la respuesta celular global al daño en el ADN, que normalmente solo se produce en sitios concretos, ATM y ATR cooperan estrechamente con otras

proteínas. Se trata de las proteínas mediadoras y las quinasas transductoras de la señal Chk1 y Chk2. Una vez ATM y ATR se localizan en el lugar de la lesión y se activan, se desencadena toda una serie de eventos en las inmediaciones que amplificarán la señal. A este nivel es fundamental el papel de los mediadores: proteínas con funciones muy diversas que modulan la actividad de ATM y ATR, facilitan las interacciones entre ATM/ATR y sus sustratos, y en un sentido más amplio median el ensamblaje espacio-temporal de complejos proteicos en la cromatina próxima a la lesión (Kastan et al. 2004). Comparten la capacidad de ser cargadas en el ADN y concentrarse en los DSB o en el ssDNA en agregados denominados focos. Los primeros eventos implicados son la fosforilación de la histona H2AX en la serina 139 (forma a la que se denomina  $\gamma$ -H2AX) y su interacción con Mdc1. El desarrollo de un anticuerpo específico de  $\gamma$ -H2AX confirmó la fosforilación masiva de H2AX cerca del DSB en lo que se denominaron a partir de ese momento *foci*. Los focos son visibles por técnicas de inmunofluorescencia y debido a la correspondencia que existe entre el número de focos de  $\gamma$ -H2AX y el número de DSB, son una de las herramientas más empleadas en el laboratorio para detectar la presencia de DSB. En respuesta a radiación ionizante, muchos de los componentes de la DDR incluyendo ATM, BRCA1, 53BP1, Mdc1, Rad51 y el complejo MRN, forman unos focos que colocalizan con los de  $\gamma$ -H2AX y que se han denominado IRIF (*Ionising Radiation Induced Foci*). En la lesión, H2AX es fosforilada por ATM, ATR y DNA-PKcs (Rogakou et al. 1998) y esta fosforilación recluta a Mdc1 que amplifica la señal de fosforilación de H2AX (Stucki et al. 2005) en regiones que pueden extenderse hasta dos megabases de cromatina (Rogakou et al. 1999). Según el modelo actual, aunque los mediadores acuden a la lesión por un mecanismo independiente de ATM, su acumulación en focos depende de la fosforilación de H2AX mediada por ATM (Celeste et al. 2003; Lukas et al. 2003; Lukas et al. 2004; Stucki et al. 2005). ATM es reclutada directamente a los extremos de ADN del DSB por el complejo MRN, fosforilando H2AX en las inmediaciones. ATM genera así una marca en las inmediaciones del DSB a la que se une directamente Mdc1. Mdc1 recluta al complejo MRN a través de Nbs1 actuando como puente molecular entre H2AX y Nbs1. Consecuentemente, el complejo MRN recluta a ATM de forma que ahora puede fosforilar a H2AX en posiciones adyacentes, generándose una reacción en cadena que amplifica la señal (Lou et al. 2006). Así, el eje  $\gamma$ -H2AX-Mdc1-Nbs1 provoca que el radio de actividad de ATM se vaya extendiendo hasta zonas muy distantes de la ruptura (Rogakou et al. 1999).

Por otro lado, en respuesta a estímulos que inducen la activación de ATR a través de la generación de ssDNA se pueden observar otros factores formando focos aunque con arquitectura diferente. Cuando se genera ssDNA, se produce una acumulación de RPA que es visualizable por inmunofluorescencia. Ésta es, a diferencia de los IRIF, independiente de  $\gamma$ -H2AX debido a que RPA es el puente de anclaje directo al ssDNA (Liu et al. 2006). Consecuentemente, ATR-ATRIP y otros factores como Rad9 y TopBP1 son reclutados en focos.

Los IRIF tienen, a pesar de esto, una función limitada en la DDR. Hay que destacar que la acumulación de estas proteínas en focos es un fenómeno posterior y funcionalmente distinto a su capacidad de acudir a las rupturas. En ausencia de  $\gamma$ -H2AX o Mdc1, factores fundamentales de la DDR como 53BP1, BRCA1 y Nbs1 pierden su capacidad de concentrarse en IRIF (Celeste et al. 2002; Stewart et al. 2003) aunque sorprendentemente esto no tiene graves consecuencias en la señalización de las rupturas, en la sensibilidad al daño y en la estabilidad genómica. Esto es debido a que conservan su capacidad de acudir a los DSB, hecho que se puede visualizar por inmunofluorescencia al generar gran cantidad de DSB en un área discreta del ADN (Celeste et al. 2003). Si alguna de estas proteínas formadoras de IRIF como Nbs1, Rad50, Mre11 o BRCA1 son esenciales para la supervivencia del organismo (Hakem 2008) es debido a que tienen otras funciones independientes de la capacidad de concentrarse en las lesiones en forma de focos que sí son fundamentales para la célula.

Esto sugiere que los eventos esenciales en la resolución de DSB ocurren estrictamente en las rupturas y que la formación de focos es solo necesaria para una correcta y eficiente respuesta al daño. Por un lado, los datos apuntan a que la función puede residir en asegurar una eficiente señalización del daño (Fernandez-Capetillo et al. 2002). La concentración de mediadores mediada por H2AX impide que éstos se despeguen de la cromatina antes de que el daño sea reparado (Kruhlak et al. 2006a; Kruhlak et al. 2006b). Otra explicación es que la progresiva concentración de transductores de la señal en las rupturas parece ser necesaria para alcanzar el nivel necesario de señalización para detener el ciclo (Yamauchi et al. 2008). Esto explicaría porqué la ausencia de H2AX, Mdc1 o 53BP1 provoca una deficiencia en los *checkpoints*, como en el caso de ATM, pero que solo se pone de manifiesto en respuesta a dosis bajas de irradiación (Fernandez-Capetillo et al. 2002; Stewart et al. 2003; Xu et al. 2002). Por lo tanto, se trataría de plataformas de amplificación de la señal que son relevantes solamente cuando hay pocos DSB, como en V(D)J y en CSR por ejemplo. El tamaño de los IRIF va creciendo conforme su número disminuye, sugiriendo que el fenómeno de concentración es necesario para mantener la parada del ciclo celular, y un indicador de la capacidad señalizadora.

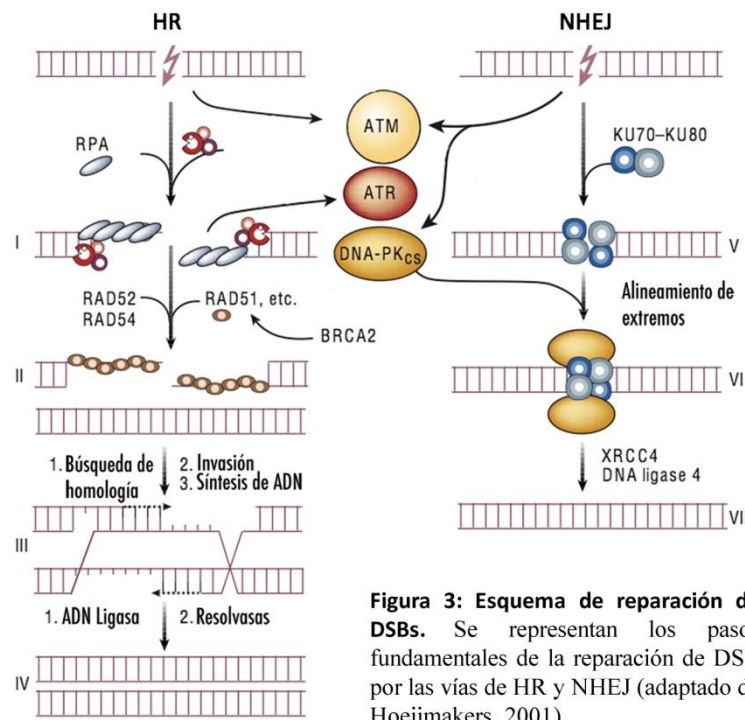
## 5. Efectos de la DDR

La señal emitida ante daño en el ADN por los transductores ATM y ATR llega finalmente a los efectores de la DDR. ATM y ATR activan a una multitud de sustratos para coordinar la progresión del ciclo celular con la reparación del ADN. Se genera así una respuesta multifacética en la que intervienen también programas de transcripción, ajustes metabólicos celulares e incluso la parada permanente del ciclo celular (senescencia) o la muerte programada de la célula (apoptosis) si el daño no puede ser reparado (figura 4).



## 5.1 Reparación

Además de los mecanismos que vigilan constantemente la generación de modificaciones puntuales de las bases, como NER (reparación por escisión de nucleótidos), BER (reparación por escisión de bases) y MMR (reparación por desapareamientos), la célula dispone de dos vías fundamentales para reparar alteraciones estructurales como las rupturas de doble cadena: la unión de extremos no homólogos (*Non-Homologous End-Joining* o NHEJ) y la recombinación homóloga (*Homologous Recombination* o HR) (Hoeijmakers 2001). Por un lado, el mecanismo de reparación más común en células mamíferas es el NHEJ, un mecanismo rápido aunque propenso a errores que liga los extremos de la ruptura de una forma rápida a expensas de generar posibles microdeleciones locales. Sin embargo, la célula puede utilizar otro mecanismo de reparación: el de HR, de alta fidelidad, basado en la recombinación homóloga entre las cromátidas hermanas (figura 3).



**Figura 3: Esquema de reparación de DSBs.** Se representan los pasos fundamentales de la reparación de DSB por las vías de HR y NHEJ (adaptado de Hoeijmakers, 2001).

En NHEJ, los extremos rotos del ADN son detectados por el heterodímero Ku70/80 que atrae a DNA-PKcs. Ésta, a su vez, atrae a más proteínas al lugar de la lesión y las fosforila. La ruptura es ligada por un complejo formado por DNA Ligasa IV y XRCC4 (Hefferin et al. 2005). A pesar de su baja fidelidad, esta vía puede actuar de forma urgente y, a diferencia de HR, no depende de que exista una molécula de ADN hermana, cosa que solo ocurre después de la replicación, y por tanto puede ser utilizada en cualquier fase del ciclo celular. Además de los DSB que ocurren aleatoriamente a lo largo del genoma, las rupturas programadas que tienen lugar en la recombinación V(D)J y en la del cambio de clase (CSR) en linfocitos son reparadas por NHEJ (Casellas et al. 1998; Nussenzweig et al. 1996).



La recombinación homóloga involucra más factores e implica más pasos que NHEJ para llevar a cabo la reparación. En primer lugar, para la búsqueda de homología en la cromátida hermana es necesaria la generación de ssDNA, por lo que los DSB son reseccionados para generar largos segmentos de cadena simple (Hiom 2000). Diferentes helicasas y exonucleasas son responsables de este proceso (Huertas et al. 2009; Mimitou et al. 2008). Tras la resección, el ssDNA es recubierto por RPA, dando paso a la búsqueda de homología en la cromátida hermana. Para ello, el segmento de ssDNA debe invadir el ADN de cadena doble (desplazando las hebras complementarias unidas) y RPA es sustituida por otra proteína con capacidades invasivas, Rad51 (Benson et al. 1994), fenómeno que está facilitado por Rad52 (New et al. 1998). La maquinaria de replicación rellena la secuencia que falta utilizando los extremos de ssDNA como cebadores. De esta forma se llega a una estructura en “unión de Holliday” que posteriormente es resuelta para separar ambas cromátidas con ayuda de una endonucleasa, una ligasa y una resolvasa (West 2003). Entre los factores implicados en HR, algunos son de extrema importancia en la supresión tumoral en humanos. BRCA1 y BRCA2 son necesarios para reclutar de forma eficiente a Rad51 y su ausencia compromete seriamente la HR (Welch et al. 2000; Yuan et al. 1999).

## 5.2 Parada del ciclo celular

El ciclo celular en eucariotas es una secuencia ordenada de eventos biológicos que se divide en fases separadas por transiciones sometidas a un estricto control. Las fases fundamentales en el metabolismo del ADN son dos: la fase de síntesis o S, donde el ADN es replicado, y la fase de mitosis o M, en la que se produce la segregación de los cromosomas replicados hacia lo que serán las dos células hijas (Norbury et al. 1992). Intercaladas entre estas dos fases se encuentran la fase G1 y la fase G2 durante las cuales la célula se prepara para abordar la síntesis y segregación del material genético respectivamente. En situaciones en las que no se requiere una proliferación continua, la célula entra en fase de reposo o quiescencia llamada G0. Existen complejos mecanismos de control que aseguran la generación de una sola copia de material genético totalmente fiel al molde original y garantizan el reparto equitativo entre las dos células hijas. En este sentido, juegan un papel muy importante, por un lado, las transiciones entre las fases del ciclo que regulan que una nueva fase no comience hasta que se dan todos los requisitos que definen la terminación de la fase anterior, y por otro, la progresión precisa y ordenada del ciclo que es asegurada por las Cdks (quinasas dependientes de ciclinas) (Morgan 1997). La activación de estas subunidades catalíticas pasa principalmente por su asociación con unas proteínas reguladoras llamadas ciclinas, cuyos niveles de expresión, a diferencia de los de las Cdks, fluctúan a lo largo del ciclo (Sherr et al. 2004). Gracias a las variaciones en los niveles de ciclinas se consigue una activación secuencial de cada uno de los complejos heterodiméricos Cdk-ciclina, clave para un avance ordenado a lo largo del ciclo.

La respuesta a daño en el ADN retrasa la progresión del ciclo celular para dar tiempo a la reparación del ADN modulando transitoriamente los mecanismos que regulan la actividad de las Cdk. En respuesta a lesiones en el ADN, la DDR puede detener el ciclo en la frontera entre G1 y S, entre G2 y M, y ralentizar la replicación durante la fase S (Abraham 2001). Estas barreras se denominan puntos de control o *checkpoints* G1/S, G2/M e intra-S. La ejecución de la señal generada por ATM y ATR en respuesta a daño se realiza a través de dos quinasas efectoras: Chk1 y Chk2. La fosforilación de Chk2 en la treonina 68 es llevada a cabo de forma específica por ATM (Matsuoka et al. 1998) y ATR fosforila a Chk1 en las serinas 317 y 345 (Liu et al. 2000; Zhao et al. 2001). En conjunto, las cuatro quinasas constituyen la fuente señalizadora que permite detener el ciclo celular en respuesta a las alteraciones en el ADN. Aunque están jerárquicamente por debajo de las quinasas transductoras, Chk1 y Chk2 son esenciales para la correcta activación de los *checkpoints*. Mecanísticamente, mientras que ATM y ATR, junto a mediadores de la respuesta, funcionan como bases emisoras en los puntos de daño o estrés replicativo, Chk1 y Chk2 son activadas en la lesión para después extender su función a todo el nucleoplasma (Lukas et al. 2003; Smits et al. 2006). De esta forma, la señal es transmitida desde la lesión hasta el conjunto de reguladores del ciclo que deben ser alcanzados para desactivar eficientemente las Cdk.

### ***Checkpoint G1/S***

Para evitar la entrada en fase S de una célula dañada, la DDR tiene dos efectores principales que funcionan en paralelo: por un lado la parada rápida del ciclo a través de Cdc25A, y por otro el mantenimiento de la parada a través de p53 (Lukas, et al. 2004). Aunque la fosforilación de ambas ocurre rápidamente y de forma simultánea, la cascada que surge de la activación de Cdc25A es más rápida porque no requiere síntesis de nuevas proteínas (Mailand et al. 2000). Sin embargo el control del *checkpoint* es llevado a cabo por la acumulación de p53, la prueba de esto es que la ausencia de p53 conlleva a la supresión total de esta parada.

La fosforilación de Cdc25A en respuesta a daño constituye una marca para su degradación por proteosomas evitando así que pueda defosforilar a Cdk2 y activarla, y esto permite mantener los complejos ciclina E/Cdk2 y ciclina A/Cdk2 inactivos. El mecanismo complementario implica la activación y estabilización de p53 a través de la fosforilación en su serina 15 por ATM (Canman et al. 1998; Tibbetts et al. 1999). Chk2, activada por ATM, también fosforila a p53 en la serina 20 y en la treonina 18 (Shieh et al. 2000; Hirao 2000). Además, ATM interacciona con el regulador negativo de p53, la ubiquitin ligasa MDM2 (Ashcroft et al. 1999; Shieh et al. 1997) y como consecuencia, la capacidad de p53 de transactivar sus genes diana aumenta considerablemente (Dumaz et al. 1999). Se induce la expresión de p21 (WAF1/Cip1) que se acumula horas después de detectarse el daño e inhibe la transición de G1 a S promovida por ciclina E/Cdk2 (Sherr et al. 1999), complementando la respuesta al mantener el arresto por más tiempo. De acuerdo con el reclutamiento de ATR a las rupturas, ATR no debería activarse en G1 ya que responde a DSB

generados a partir de la resección de ssDNA, lo que no ocurre en G1, por lo que la estabilización de p53 quedaría a cargo únicamente de ATM y su quinasa efectora Chk2.

### ***Parada intra-S***

Este *checkpoint* es en realidad un retraso reversible y transitorio de la progresión del ciclo, más que una parada, principalmente debido a que se impide el inicio de nuevos orígenes de replicación. Esto se produce a través de la degradación de Cdc25A e inhibición de Cdk2 (Bartek et al. 2003; Bartek et al. 2004). Se ha sugerido que otro efector en este *checkpoint* es la fosforilación por ATM de la cohesina SMC1 (Kitagawa et al. 2004).

Además de la parada, el *checkpoint* intra-S protege, por un mecanismo no muy claro todavía, del colapso de las horquillas de replicación (por ello se le llama también *checkpoint* de replicación) estabilizándolas y previniendo que se produzcan rupturas de doble cadena (Osborn et al. 2002; Bartek et al. 2004).

### ***Checkpoint G2/M***

La parada en la transición G2/M evita que entren en mitosis células que han sufrido lesiones durante G2 o que han progresado a través de G2 con lesiones no reparadas desde G1 o S. La acumulación de células en G2 también puede ser un reflejo del *checkpoint* de replicación que ha detectado lesiones durante la replicación del ADN señalizadas por ATR. La diana fundamental del *checkpoint* G2/M es la actividad de ciclina B/Cdk1. La fosforilación en respuesta a daño de Cdc25A por Chk1 y Chk2, aunque fundamentalmente por Chk1, impide la activación del complejo ciclina B/Cdk1 (Donzelli et al 2003). De nuevo, el eje p53/p21 se encarga del mantenimiento del *checkpoint* aunque tiene un papel menos importante que en el *checkpoint* G1/S (Taylor et al. 2001; Nyberg et al. 2002).

## **5.3 Senescencia**

El fenómeno conocido como senescencia replicativa fue descrito *in vitro* hace casi 50 años en células humanas (Hayflick et al. 1961) al observar que fibroblastos humanos en cultivo seriado entraban en una parada celular irreversible después de 50-70 divisiones. Posteriormente se demostró que p53 media este tipo de parada junto con el eje supresor de tumores p16/Rb, aunque la importancia de p53 es considerablemente mayor en células murinas que en células humanas. Actualmente se considera la senescencia como una respuesta a estrés implicada en la protección frente al cáncer e involucrada en el envejecimiento del organismo. Uno de los desencadenantes de la parada permanente es el acortamiento telomérico. Los telómeros se van acortando en cada ciclo de replicación y pueden alcanzar una longitud mínima crítica en la que las estructuras protectoras de los cromosomas ya no se pueden formar, quedando expuestos los extremos de ADN libres.

Estos telómeros disfuncionales son reconocidos como DSB y son capaces de disparar una DDR (D'Adda Di Fagagna et al. 2003; Martens et al. 2000; Takai et al. 2003). Otras formas de daño permanentes, como el estrés oxidativo en cultivo (Parrinello et al. 2003) y agentes genotóxicos (Di Leonardo et al. 1994; Te Poele et al. 2002), pueden inducir senescencia prematura. En la década pasada se descubrió que se podía inducir una parada irreversible y prematura, con características similares a la senescencia replicativa, mediante la activación de oncogenes en fibroblastos en cultivo (Serrano et al. 1997), fue descrita como senescencia producida por oncogenes (*Oncogene Induced Senescence* o OIS). Esta parada es activada por p53 y mediada por p19 Arf. Sin embargo, hasta hace pocos años la comunidad científica no terminaba de aceptar la senescencia como un fenómeno de relevancia real, ya que no se había probado que sucediera *in vivo*. Hoy se sabe que la senescencia sucede en lesiones tumorales humanas y murinas (Braig et al. 2005; Chen et al. 2005; Collado et al. 2005). Además, durante años se ha intentado identificar la naturaleza del estrés oncogénico. Recientemente se ha revelado que algunos oncogenes como Ras, CDC6, STAT5 o ciclina E desencadenan una DDR asociada a la hiperreplicación del ADN que activa el proceso de senescencia (Bartkova et al. 2005; Di Micco et al. 2006). Las vías moleculares responsables de la senescencia dependen en mayor o menor medida de la desactivación total de la actividad mediada por p53 y/o Rb, en cuyo control son relevantes los productos del *locus* Ink4a/ARF, p16 y p19. En células humanas la senescencia se acompaña de la aparición de unos focos de heterocromatina denominados SAHF (*Senescence Associated Heterochromatin Foci*) visibles en inmunofluorescencia al teñir los núcleos con DAPI. Estos focos, ricos en la proteína HP1 $\gamma$  (*Heterochromatin Protein  $\gamma$* ) y en la marca epigenética H3K9 tri-metilada mantienen reprimida por compactación de la cromatina la transcripción de genes esenciales para la proliferación como genes diana de E2F (Narita et al. 2003).

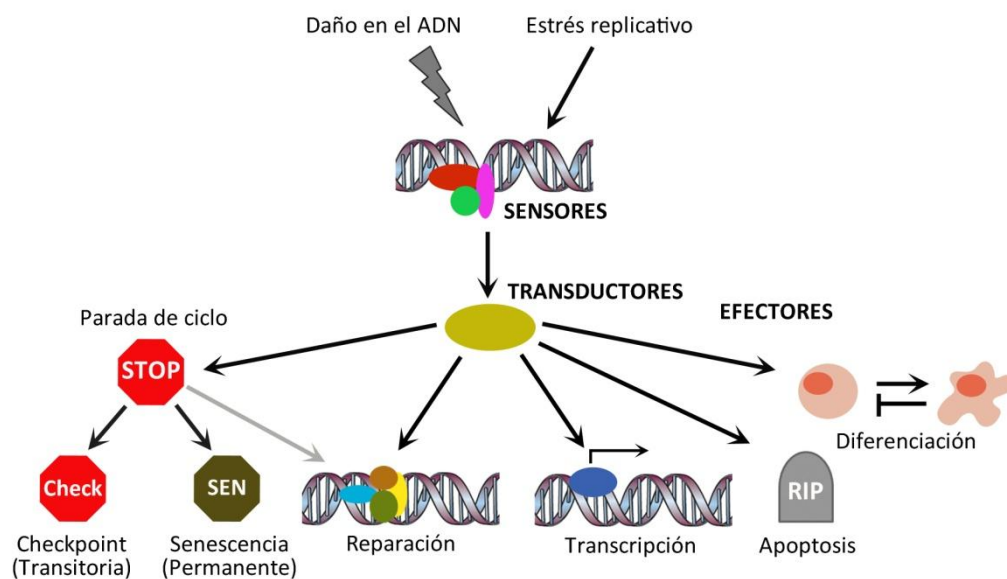
### 5.4 Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo de muerte ejecutada activamente por la célula. La decisión de optar por la muerte celular y no por otras respuestas menos severas viene determinada fundamentalmente por la intensidad de la señal, que es proporcional al número y gravedad de las lesiones, y por la sensibilidad de cada tipo celular al daño. Sin embargo, se desconoce cómo esta aparente dualidad está regulada. El efector principal de la apoptosis en respuesta a DSB es p53. Al ser activado por la DDR, induce la expresión de genes implicados en desencadenar los procesos mitocondriales necesarios para la muerte celular como Puma, Noxa y Bax (Miyashita et al. 1995; Nakano et al. 2001; Oda 2000). Estos genes cooperan en la despolarización de la membrana mitocondrial y la salida del citocromo c al citosol (Willis et al. 2007). Este fenómeno provoca la formación de diversos complejos proteicos proapoptóticos latentes y culmina con la activación de

enzimas denominadas caspasas y la ejecución de la muerte celular mediante degradación controlada del ADN otros componentes celulares.

## 5.5 Diferenciación

La disminución de la población de células madre por acumulación de daño en el ADN se ha evidenciado en animales con inestabilidad genómica (Ruzankina et al. 2007; Murga et al. 2009). Hasta hoy, se consideraba que esta reducción se debía a dos efectos principales de la DDR: la senescencia y la apoptosis en las células madre (Ruzankina et al. 2008; Sharpless et al. 2007). Sin embargo, un estudio del impacto del daño en el ADN *in vivo* en células madre melanocíticas (proveedoras de melanocitos maduros necesarios para la pigmentación del pelo) reveló que la DDR induce la diferenciación de las células madre cuando el daño no puede ser reparado (Inomata et al. 2009). Esta diferenciación disminuye el *pool* de células madre y conlleva a la aparición de pelo gris en los animales. La DDR ayudaría así a mantener la calidad de la población de células madre al eliminar aquellas que están dañadas induciendo la diferenciación en el nicho.



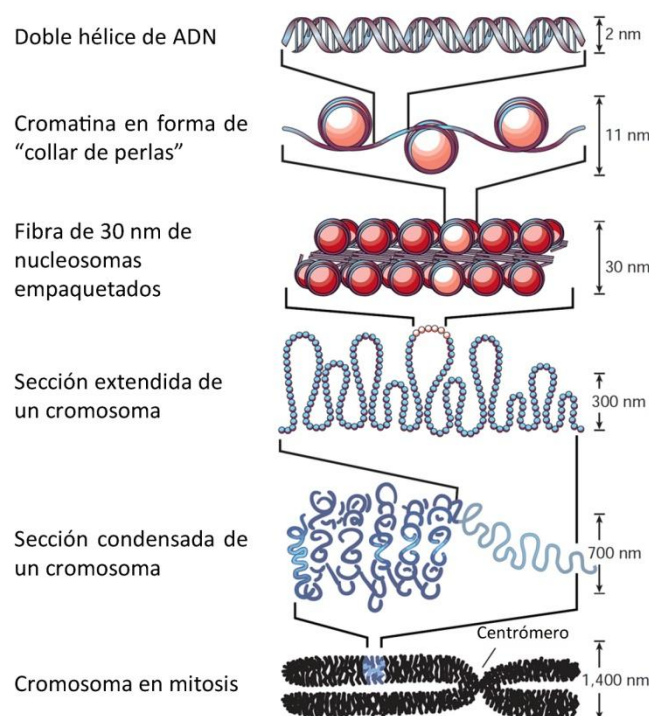
**Figura 4: Efectos de la DDR.** Esquema de los efectos de la DDR sobre el metabolismo celular. Cada respuesta depende del contexto celular, del tipo y de la cantidad de daño. (Adaptado de Zhou and Elledge, 2001)

## 6. Dinámica de la cromatina

### 6.1 Organización del material genético en forma de cromatina

El nucleosoma es la unidad fundamental de la cromatina (Kornberg 1974). Consiste en un octámero de proteínas que contiene dos moléculas de cada una de las histonas canónicas (o core histones) H2A, H2B, H3 y H4, alrededor del cual se enrollan aproximadamente 147 pb de ADN. Otra histona, la histona H1, se extiende sobre la molécula de ADN fuera de la parte central del nucleosoma.

El polímero de ADN-nucleosoma es una molécula dinámica que existe bajo muchas configuraciones. Históricamente, la cromatina se ha clasificado como eucromatina y heterocromatina de acuerdo con su estado de condensación. Así, eucromatina hace referencia a cromatina descondensada, sea o no sea transcripcionalmente activa, y heterocromatina a cromatina altamente compactada y transcripcionalmente inactiva. Ésta puede estar silenciada permanentemente (heterocromatina constitutiva) allí donde hay genes que raramente se expresan en las células del organismo, o su transcripción puede estar reprimida en algunas células durante un determinado ciclo celular o estado del desarrollo (heterocromatina facultativa).



**Figura 5: Niveles de empaquetamiento de la cromatina**  
(adaptado de Felsenfeld and Groudine, 2003)

La fibra de cromatina de 11 nm llamada “collar de perlas” representa la configuración activa y no plegada del ADN en interfase (figura 5). Esta fibra no siempre está constituida de nucleosomas separados de una forma uniforme, los nucleosomas están agrupados irregularmente y plegados en estructuras de orden superior. El segundo nivel de organización es “la fibra de 30 nm”, compuesta por nucleosomas empaquetados unos sobre otros adoptando disposiciones regulares. Esta estructura se produce gracias al reclutamiento de la histona H1 y de factores “arquitectónicos” de unión a cromatina como son HP1 o factores Polycomb. El paso siguiente es la organización en bucles mayores de 300 a 700 nm de diámetro que ocurre seguramente a través del anclaje de la fibra de cromatina a la periferia nuclear u otros anclajes nucleares como las láminas nucleares. La estructura más condensada que adopta el ADN son los cromosomas. Se forman durante metafase y permiten la correcta segregación de las dos copias del genoma a cada célula hija. Esta condensación máxima de la cromatina permite la reestructuración de la molécula de ADN de aproximadamente dos metros de largo en cromosomas discretos de alrededor de 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro.

## 6.2 Mecanismos de regulación de la compactación de la cromatina

### Modificaciones de histonas y el Código de Histonas

Las histonas son proteínas pequeñas y muy básicas formadas por un dominio globular y unas colas C-terminales y N-terminales, no estructuradas, que sobresalen de la estructura del nucleosoma. Están altamente conservadas en su secuencia de aminoácidos desde levaduras hasta el ser humano lo que da apoyo a la idea general de que estas proteínas, incluso sus dominios no estructurados, tienen una función crítica. En los últimos diez años se ha descubierto una gran cantidad de modificaciones postraduccionales en las colas de las histonas que forman parte del nucleosoma y que conducen a un cambio de función, sobre todo en las histonas H3 y H4. Se ha identificado una amplia gama de enzimas modificadoras de histonas con funciones como acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoylación, ADP-ribosilación, deiminación e isomerización de prolinas. La combinación de modificaciones o marcas producidas por estas enzimas sugirió que podrían constituir un código que regula procesos como transcripción, reparación del ADN y apoptosis: el Código de Histonas (Jenuwein et al. 2001; Turner 2000). Las modificaciones en las colas de las histonas pueden por sí mismas influenciar el grado de compactación de la cromatina afectando al contacto entre las histonas de nucleosomas adyacentes o a la interacción de las histonas con el ADN. Sin embargo, se piensa que el principal mecanismo por el que estas modificaciones alteran la estructura de la cromatina es controlando la unión de proteínas efectoras a la cromatina (Shogren-Knaak et al. 2006), algunas, como los remodeladores, tienen capacidad de alterar los contactos ADN-histonas. Las proteínas efectoras poseen dominios

que reconocen modificaciones de histonas (marcas) específicas. Por ejemplo, los bromodominios se unen a residuos de lisina acetilados, mientras que los cromodominios y los dominios tudor se unen a diferentes residuos metilados.

### **Complejos remodeladores de la cromatina**

Existen enzimas con un papel remodelador de la cromatina dependiente de ATP que pueden alterar la estructura de la cromatina. El término remodelación de la cromatina incluye una gran variedad de cambios en la estructura que en definitiva implican un cambio en el contacto histona-ADN ya sea por reposicionamiento de los nucleosomas en el ADN, por la eliminación de parte o todo un octámero de histonas, por inducir un cambio en la accesibilidad de proteínas como factores de transcripción o nucleasas al ADN, o por el intercambio de histonas canónicas por variantes de histonas. Como complejos remodeladores de cromatina con alguna función en la DDR se encuentran por ejemplo: RSC, SWI/SNF, INO80 y SWR. La actividad remodeladora de RSC está implicada en recombinación homóloga (Chai et al. 2005) y un reciente trabajo demuestra que RSC moviliza rápidamente los nucleosomas cercanos a los DSB hacia nuevas posiciones (Shim et al. 2007). El complejo SWI/SNF se localiza en los DSB y participa en la remodelación que ocurre en la sinapsis entre el ADN roto y su molde homólogo en levaduras (Chai et al. 2005). En mamíferos, facilita la reparación de los DSB y es necesario para la fosforilación de H2AX (Park et al. 2006). Por otra parte, el complejo INO80 se concentra en los DSB a tiempos tardíos (Downs et al. 2004; van Attikum et al. 2004; Morrison et al. 2004), atraído por  $\gamma$ -H2AX, y parece estar implicado en la reparación de éstos y en la duración de marca  $\gamma$ -H2AX (Papamichos-Chronakis et al. 2006). Por último, el complejo SWR tiene la capacidad de reemplazar las histonas H2A y H2B por dímeros formados por H2B y la variante H2AZ en levadura (Mizuguchi et al. 2004). En células eucariotas podría ser el complejo Tip60, con actividad acetiltransferasa en los DSB, el que podría facilitar el intercambio posterior de la histona H2A por H2AZ (Kusch et al. 2004).

### **Las variantes de histonas**

Los organismos eucariotas tienen numerosas variantes de histonas con composición diferente en aminoácidos que pueden afectar a la estructura de nucleosomas individuales y a su capacidad para formar estructuras de orden superior. Se trata de histonas especializadas que se encuentran en muy baja proporción en el genoma y que confieren especialización a la cromatina. Se ha propuesto que tienen un patrón de modificaciones distinto debido al pequeño número de aminoácidos que las diferencia de las histonas canónicas. Solo las histonas H3 y H2A presentan variantes de histonas. Para H3 existe la variante H3.3, relacionada con actividad transcripcional, y CenpA, específica del centrómero y esencial para la segregación cromosómica. Para H2A, las variantes H2AZ, H2AX y MacroH2A. La función de H2AZ sigue siendo un enigma. En cambio, se sabe que H2AX está



implicada en la detección del daño en el ADN y que MacroH2A es la histona H2A que se encuentra en gran abundancia en el cromosoma X inactivo en mamíferos.

### La histona H1

La fibra de cromatina tiene una quinta histona, la histona H1 o histona *linker*, que no forma parte del nucleosoma pero interviene en la estructura de orden superior de la cromatina. La histona *linker* protege las 20 pb de ADN internucleosómico de su degradación por nucleasas. En organismos eucariotas superiores, la estequiometría entre nucleosomas e histona H1 es equimolar, lo que invita a pensar que H1 tiene un papel estructural o funcional importante en la cromatina. El conocimiento del papel de H1 es muy escaso debido a que, por un lado, su eliminación en eucariotas unicelulares ha revelado que H1 no es esencial (Drabent et al. 2000; Rabini et al. 2000), y por otro lado, a la dificultad de trabajar con H1 en ratón, donde existen 8 genes que codifican para 8 subtipos diferentes de H1. Además, los ratones *knock-out* generados para uno o dos de los subtipos de H1 son fenotípicamente normales (Fan et al. 2001; Sirotkin et al. 1995). Cuando se eliminan tres de los subtipos (H1c, H1d y H1e) y se consigue el 50% de los niveles de H1 se produce un grave fenotipo en los ratones: la muerte en el estado embrionario E11.5 a causa de diversos defectos en su desarrollo (Fan et al. 2003). Por lo tanto, al contrario de lo que ocurre en eucariotas unicelulares, en ratón, H1 es esencial para el desarrollo. Un estudio llevado a cabo en células embrionarias derivadas de este modelo murino mostró que la disminución del 50% de los niveles de H1 conduce a profundos cambios en la estructura de la cromatina (Fan et al. 2005). Se vio que estos niveles de H1 equivalen a un ratio de una única molécula de H1 por cada cuatro nucleosomas, y como consecuencia se produce una ligera disminución de la distancia entre nucleosomas en estas células. Los bajos niveles de H1 solo afectan a dos modificaciones de histonas: disminuyen los niveles de H4K12 acetilada y de H3K27 tri-metilada y la expresión de muy pocos genes se vio afectada. Lo que más destacamos de este trabajo es que al observar los polinucleosomas por microscopía electrónica se descubrió cómo las células con niveles reducidos de H1 presentaban una cromatina menos compacta y con conformaciones más variables.

### 6.3 Relación entre la estructura de la cromatina y la DDR

La maquinaria de reparación tiene que hacer frente a rupturas en un ADN relativamente inaccesible por estar incluido en la estructura altamente compactada de la cromatina. Existen evidencias de que componentes de la DDR facilitan esta tarea alterando el entorno cromatínico tras un DSB. Alteraciones locales en la cromatina, como la exposición de residuos de histonas metilados próximos a la lesión (Huyen et al. 2004; Sanders et al. 2004) o la creación de nuevas modificaciones de histonas por la DDR, pueden facilitar la reparación al generar nuevos sitios de unión para las proteínas de la DDR (Peterson et al. 2004). Por ejemplo, 53BP1 tiene dominios

tudor de unión a la cromatina que la situarían cercana a la cromatina o, como se ha sugerido en diversos trabajos, que facilitarían su reclutamiento rápido en forma de focos a través del reconocimiento de modificaciones de histonas en los DSB (Ward et al. 2003; Zgheib et al. 2009; Huyen et al. 2004). De esta forma, cambios en la acetilación y fosforilación en la cromatina adyacente a la ruptura pueden influir en la accesibilidad de las proteínas de señalización y reparación del daño.

La modificación de histona inducida por la DDR más caracterizada es la fosforilación de H2AX en su cola C-terminal (Rogakou et al. 1998; Fernandez-Capetillo et al. 2004), dando lugar a la marca conocida como  $\gamma$ -H2AX, que se extiende a lo largo de la cromatina que flanquea un DSB (Rogakou et al. 1999; Downs et al. 2004; Shroff et al. 2004). Se desconoce cómo afecta  $\gamma$ -H2AX a la estructura de la cromatina ya que mientras que en *S.cerevisiae* se la relaciona con una relajación de la cromatina (Downs et al. 2000), en ratón se ha visto que  $\gamma$ -H2AX es necesaria para la condensación y el silenciamiento de los cromosomas sexuales masculinos en espermatogénesis (Fernandez-Capetillo et al. 2003). Como ya se ha comentado, las células de ratones *knock-out* para H2AX presentan dificultades para establecer un *checkpoint* G2/M en respuesta a pequeñas dosis de irradiación (Fernandez-Capetillo et al. 2002). Por ello se ha sugerido que  $\gamma$ -H2AX es responsable de la concentración de proteínas en la cromatina que flanquea la lesión y se ha propuesto a esta marca como un evento crucial para amplificar la señal cuando el daño se encuentra por debajo de un determinado umbral. Por otra parte,  $\gamma$ -H2AX es necesaria para la resolución de los DSB en linfocitos durante el proceso de *class switch recombination* (Celeste et al. 2002). Se propuso que la propagación de esta marca a lo largo del dominio implicado en *class switch recombination* facilita la sinapsis entre los DSB separados hasta de 200 kb. No obstante se cree que la fosforilación de H2AX modula de alguna forma la arquitectura de la cromatina puesto que organiza el ensamblaje de remodeladores de cromatina como INO80 (van Attikum et al. 2004; Morrison et al. 2004) y NuA4/Tip60 (Downs et al. 2004; Kusch et al. 2004; Tsukuda et al. 2005) y de complejos proteicos en focos visibles en la cromatina tras un DSB (Paull et al. 2000; Bassing et al. 2002; Celeste et al. 2002).

El seguimiento por microscopía de la cromatina dañada ha revelado que, aunque la cromatina que contiene la lesión permanece inmóvil, se produce una expansión local de la cromatina que flanquea el DSB en los segundos posteriores a la generación de la lesión de forma que la densidad de las fibras disminuye un 30-40% (Kruhlak et al. 2006a). Se trata de un fenómeno dependiente de energía pero independiente de  $\gamma$ -H2AX y de ATM. En condiciones de bajos niveles de ATP, la cromatina no se relaja y los sensores no se reclutan a la ruptura, aunque se mantienen próximos a la región dañada. Este descubrimiento es consistente con estudios anteriores que proponían que los complejos remodeladores de cromatina, dependientes de ATP, tienen un papel fundamental en los primeros momentos de la respuesta a daño en el ADN. La relajación de la cromatina en los DSB

establece un entorno subnuclear más accesible para las proteínas. En ausencia de  $\gamma$ -H2AX, los factores que han acudido a las rupturas, incluyendo remodeladores, “caen” de la cromatina antes de que las lesiones sean reparadas. Según este modelo, a pesar de que H2AX es fosforilada rápidamente en respuesta a los DSB, no es necesaria para la expansión inicial de la cromatina ni para el reconocimiento inicial de las rupturas (Celeste et al. 2003). Por lo tanto se ha sugerido que el verdadero papel en la arquitectura de la cromatina de H2AX pueda ser el mantenimiento de la conformación abierta alrededor de la lesión, sin la cual se pierden gradualmente los factores de reparación y la señal de *checkpoint* aunque el DSB persista (Kruhlak et al. 2006a).

Por otra parte, dejando de lado los cambios locales que se producen en la lesión, trabajos publicados hace 20 años demostraron que las rupturas de doble cadena en el ADN por UV provocan una relajación global de la cromatina (Hittelman et al. 1984; Ljungman 1989). Un trabajo reciente evidencia que, tras la formación de DSB, se produce una relajación de la cromatina a un nivel más global mediada por ATM: ATM fosforila a Kap-1 en la lesión y Kap-1 se propaga rápidamente a lo largo de la cromatina, esto provoca una relajación de la cromatina que facilita la reparación de las rupturas (Ziv et al. 2006). De la misma forma, la exposición a radiación UV aumenta la accesibilidad de la cromatina en un proceso que estaría mediado por p53 (Rubbi et al. 2003). Los autores del trabajo proponen que la relajación de la cromatina facilita la supervisión de la integridad genómica al permitir un acceso más rápido a los DSB. Por otra parte, se ha descubierto que, instantes después de la generación de DSB, la proteína HP1 $\beta$  que normalmente se encuentra unida a la cromatina a través del reconocimiento de H3K9me, se moviliza de la cromatina, en un proceso que parece necesario para la fosforilación de H2AX (Ayoub et al. 2008). Se ha propuesto que una cascada de señalización, desconocida por el momento, ayudaría a iniciar la DDR alterando la cromatina, en este caso, modificando los mediadores del código de histonas pero no el código de histonas en sí.

A pesar de estas evidencias, hoy todavía se desconoce la naturaleza de los cambios que induce la DDR en la cromatina y, sobre todo, se desconoce la contribución de la compactación global de la cromatina en el acceso, señalización y reparación de las rupturas. En esta Tesis nos preguntamos si la DDR es mejorable mediante la eliminación parcial de la barrera que supone la compactación de la cromatina. Para ello, estudiamos a nivel celular las consecuencias de una cromatina más laxa con un modelo genético que presenta menores niveles de histona H1 (Fan et al. 2005).

Los resultados presentados en esta Tesis con células deficientes en H1 impulsaron la realización de un proyecto que permitiera evaluar las consecuencias de “abrir” la cromatina *in vivo*. No obstante, abrir la cromatina a través de la disminución de los niveles de H1 no era posible *in vivo* ya que resulta ser letal durante el desarrollo embrionario del ratón. Al descubrirse recientemente la función compactadora *in vitro* de una proteína llamada L3MBTL1 (Trojer et al.

2007), nos resultó viable la generación de un modelo genético murino que podría presentar una estructura cromatínica globalmente más abierta por la delección de este gen.

## 7. L3MBTL1: una proteína compactadora de la cromatina

La proteína humana L3MBTL1 es una proteína única: por sí misma compacta la cromatina. Contiene 3 dominios distinguibles que la caracterizan llamados MBT. El dominio MBT (*Malignant Brain Tumor*) se describió por primera vez en la proteína supresora de tumores *l(3)mbt* de *Drosophila melanogaster*. La mutación recesiva o sensible a temperatura de este gen causa la transformación maligna en el cerebro de la larva e hiperproliferación no maligna de los discos imaginales (Gateff et al. 1993). El clonaje del cDNA reveló que la proteína contiene repeticiones en tándem de un motivo, desconocido en aquella época, de entre 99 y 103 aminoácidos al que llamaron MBT (Wismar et al. 1995). Todas las mutaciones que causaron un fenotipo maligno en *Drosophila* están en los tres MBT o cerca de ellos, lo que sugiere que son importantes para la función de *l(3)mbt*. Poco más tarde se descubrieron dos dominios MBT en una proteína *polycomb* de *Drosophila* denominada Scm (Bornemann et al. 1996). Desde ese momento hasta ahora, se han identificado numerosas proteínas con dos, tres y cuatro dominios MBT en tándem altamente conservadas desde *Drosophila melanogaster* hasta el ser humano. Hasta la fecha se han identificado cuatro genes por su homología con *l(3)mbt* en el ser humano: L3MBTL1 (o L3MBTL) (Koga et al. 1999), L3MBTL2, L3MBTL3 y L3MBTL4.

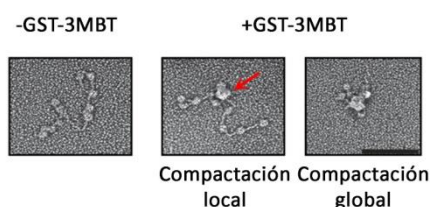
El dominio MBT está relacionado evolutivamente con la familia Royal de dominios de unión a cromatina que incluye a Tudor, Agenet, Chromo y PWWP (Maurer-Stroh et al. 2003). Todos ellos son *chromatin readers* o lectores de cromatina: reconocen y se unen a modificaciones de histonas y se encuentran normalmente en proteínas que se unen a cromatina. Concretamente, todos los dominios MBT que se han estudiado hasta el momento se unen a residuos de lisina metilados de las colas de las histonas.

### 7.1 Función compactadora

Nuestro interés en esta proteína, muy poco estudiada, radica en un trabajo publicado en el año 2007 por el grupo liderado por Danny Reinberg (Trojer et al. 2007). Este trabajo demuestra que L3MBTL1 humana compacta la cromatina *in vitro* a través de un mecanismo dependiente de modificaciones de histonas: L3MBTL1 reconoce las marcas H4K20me1 o H1bK26me1/2 en diferentes nucleosomas. Para demostrarlo, se reconstituyeron oligonucleosomas usando histonas recombinantes que carecen de modificaciones post-traduccionales. Tomando en consideración que la acetilación de histonas facilita el ensamblaje de la cromatina en una conformación abierta (fibra

de 11 nm o conformación en “collar de perlas”), se pretrató a las histonas recombinantes con histonas acetiltransferasas. Al incubarse estas fibras de cromatina en presencia de una proteína recombinante que posee los tres dominios MBT de L3MBTL1 fusionados a GST (3MBT-GST), se produjo la unión de los dominios MBT a la cromatina solo después de la incorporación de grupos metilo en H4K20. Concretamente, la unión se produjo cuando el grupo metilo era introducido por PR-Set7, enzima que cataliza la monometilación en H4K20. Lo mismo se observó cuando se incorporó en la cromatina recombinante H1 pre-metilada en K26. Las imágenes de microscopía electrónica mostraron el dato más interesante: 3MBT-GST produce la compactación de los oligonucleosomas metilados pero no de los no metilados (figura 6).

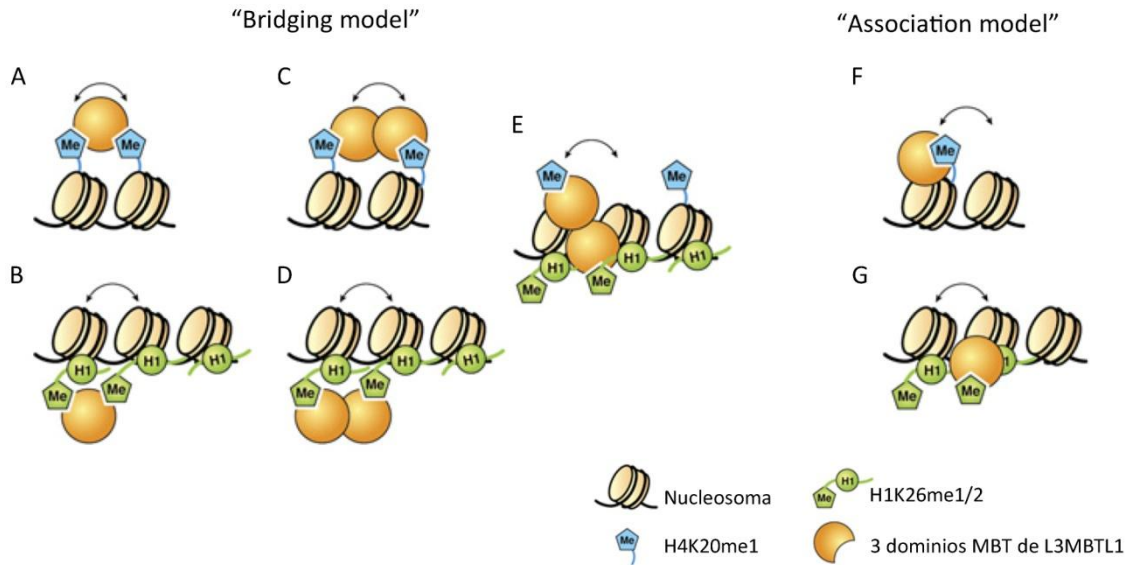
Diversos análisis mutacionales y los resultados de la reciente co-cristalización de los MBT de L3MBTL1 con péptidos de histonas modificadas confirman que es el segundo dominio MBT el responsable de la unión a las lisinas metiladas de las histonas. Se ha identificado una mutación puntual que anula la unión de H1K26me1/2 y no afecta al reconocimiento de H4K20me1. Como no existe una secuencia consenso para los residuos que rodean H4K20 (RHRKVLR) y H1K26 (para H1b; KARKSAG), la manera en que los residuos son reconocidos por el mismo “pocket” es un misterio. Se ha propuesto un modelo de unión descrito como “cavity insertion” en el que solo la parte metilada de la cola de la histona establece contacto con MBT lo que podría explicar parcialmente la promiscuidad de los dominios MBT por la unión a lisinas metiladas de histonas *in vitro*.



**Figura 6: Compactación de la cromatina *in vitro* por los dominios MBT de L3MBTL1.** Microscopía electrónica de nucleosomas recombinantes con H4K20me1 en ausencia (A) o presencia de los 3 dominios MBT de L3MBTL1 humana (B). (Trojer et al. 2007).

Teniendo en cuenta que el segundo MBT podría albergar dos residuos modificados y que la proteína puede existir en forma de homodímero *in vivo* (por interacción de su dominio SPM), se han propuesto dos posibles modelos de compactación de la cromatina por L3MBTL1 (figura 7).

En el modelo puente (o “Bridging model”) L3MBTL1, en forma de monómero o dímero, se une a dos nucleosomas adyacentes simultáneamente moviéndolos hasta acercarlos entre sí. En el modelo alternativo (o “Association model”) una molécula de L3MBTL1 (monomérica o dimérica) puede compactar la cromatina colocándose en la superficie del nucleosoma de una forma que promovería la torsión del ADN *linker* o facilitaría la interacción histona-histona. En este modelo, el correcto posicionamiento de L3MBTL1 sería posible por el reconocimiento específico de H4K20me1 en el nucleosoma o de H1K26me1/2 en la superficie del cromatosoma.



**Figura 7: Modelos alternativos para la compactación de nucleosomas *in vitro* por L3MBTL1.** En el “Bridging model”, un monómero o dímero de L3MBTL1 une dos nucleosomas simultáneamente acercándolos entre sí. En el caso de un monómero, una molécula conteniendo 3 dominios MBT puede acomodar (A) 2 residuos H4K20me1 o (B) 2 residuos H1K26me1/2 en histonas de nucleosomas o cromatosomas adyacentes respectivamente. Para simplificar, solo está representada una de las dos marcas que une cada monómero. El homodímero podría acomodar 4 marcas de cada tipo (C) H4K20me1 o (D) H1K26me1/2, o 2 de cada (E). En el “Association model” las moléculas de L3MBTL1 (monoméricas o diméricas) se colocarían en la superficie del nucleosoma uniéndose a H4K20me1 o H4K26me1/2 respectivamente, conduciendo a un estado de compactación de la cromatina por favorecer interacciones histona-histona o al generar torsión en el espacio internucleosómico. En este caso solo se ha representado la forma monomérica de la proteína para simplificar (adaptado de Trojer et al, 2007).

## 7.2 Función transcripcional

Se ha sugerido que L3MBTL1 reprime la expresión génica de determinados genes mediante dos mecanismos alternativos y quizás no excluyentes: uno basado en el reclutamiento a promotores y otro basado en la disminución de la accesibilidad de la maquinaria transcripcional al ADN por compactación de la cromatina. Una posibilidad es que L3MBTL1 reprima la cromatina indirectamente, reclutando complejos represores como HP1 $\gamma$ , con el que se ha visto que coprecipita (Trojer et al. 2007). HP1 $\gamma$  es un componente conocido de estructuras represivas de la cromatina como son los SAHF (Zhang et al. 2007) donde se concentran, en focos de heterocromatina, genes proliferativos como genes diana de E2F. Apoya esta hipótesis el hecho de que otra proteína con la que coprecipita L3MBTL1 es Rb, implicada en la formación de SAHF.

Otra posibilidad es que L3MBTL1 sólo reprima la transcripción génica al unirse a sus promotores. Curiosamente, las secuencias génicas a las que se ha visto que se une L3MBTL1 son igualmente promotores de genes diana de E2F implicados en proliferación, como ciclina E1 y c-myc, cuya expresión aumenta al disminuir los niveles de L3MBTL1 (Trojer et al. 2007). Se ha

sugerido que L3MBTL1 podría ser llevada a promotores *in vivo* por el represor transcripcional TEL a través de interacciones entre su dominio SPM y el dominio SAM de L3MBTL1 (Boccuni et al. 2003). Aún así, parece improbable que la función de L3MBTL1 sea únicamente la de reclutarse a la cromatina y actuar como represor transcripcional. Alternativamente, es concebible que se una a modificaciones de histonas para reprimir la cromatina. Apoyando esta hipótesis encontramos que L3MBTL1 reprime la transcripción de RUNX1, un regulador de la diferenciación hematopoyética, a través de H4K20me1 (Sims et al. 2008). Podría ser PR-Set7, la metilasa responsable de la marca H4K20me1, el catalizador de esta represión (Nishioka et al. 2002).

### 7.3 L3MBTL1 como posible gen supresor de tumores

L3MBTL1 es un gen candidato a ser supresor de tumores en el ser humano. El primer indicio es que su homólogo en *Drosophila melanogaster* lo es, y las proteínas entre ambas especies presentan alta homología. El gen L3MBTL1 en el ser humano se encuentra en una región del cromosoma 20 (20q12) delecionada en algunas enfermedades hematopoyéticas como desórdenes mieloproliferativos, síndromes mielodisplásicos, leucemias mieloides y policitemia vera (Bench et al. 2000; MacGrogan et al. 2004). Aunque el análisis de líneas celulares heterocigotas para esta deleción no reveló mutaciones ni alteración en los niveles de expresión del alelo restante de L3MBTL1 (Bench et al. 2004; MacGrogan et al. 2004) ni tampoco pérdida preferencial del alelo silenciado y con impronta (Li et al. 2004; Bench et al. 2004), no existen evidencias suficientes para excluir un posible papel de L3MBTL1 en cáncer. Existen numerosas evidencias que conectan a L3MBTL1 con la vía de represión transcripcional E2F/Rb, alterada en diversos tipos de cáncer. Además de copurificar con Rb y HP1 $\gamma$ , y de reclutarse a genes diana de E2F, L3MBTL1 se ha identificado como regulador de esta vía en un rastreo de represores de la actividad de E2F en células de *Drosophila melanogaster* (Lu et al. 2007).

Pese a su descubrimiento como gen supresor de tumores en *Drosophila* hace años, es recientemente que el estudio de L3MBTL1 ha despertado interés en la comunidad científica. El conocimiento que se tiene de la proteína hasta la fecha la posiciona en un lugar muy interesante como posible regulador de procesos como cáncer, transcripción, proliferación y compactación de la cromatina. Resulta interesante que L3MBTL1, con función compactadora de la cromatina *in vitro*, se una a HP1 $\gamma$ , una proteína asociada a heterocromatina y que se encuentra formando parte de los SAHF. Se ha sugerido que los SAHF son necesarios para el establecimiento o mantenimiento de la senescencia. Esto establece una conexión entre L3MBTL1 y senescencia que podría explicar su papel supresor de tumores en *Drosophila*. Por otra parte, especulamos que L3MBTL1 pueda tener un papel en diferenciación celular ya que este proceso requiere la compactación de regiones de la cromatina para la represión génica. Al no existir evidencias de otra proteína capaz de compactar la

## INTRODUCCIÓN

cromatina *per se*, L3MBTL1 se convirtió en un excelente candidato para estudiar el papel de la compactación de la cromatina *in vivo*. La generación de un modelo murino deficiente en esta proteína podría revelar su participación en desarrollo y diferenciación, en proliferación, en el control de la transcripción génica y en la senescencia celular, además de su papel como gen supresor tumoral.



# OBJETIVOS



## OBJETIVOS

### 1. Determinar los requerimientos de ATM, ATR, Chk1 y Chk2 ante daño en el ADN producido por radiación ionizante

- Determinar la jerarquía de activación de ATM, ATR y Chk1 en la respuesta a daño en el ADN inducido por radiación ionizante.
- Estudiar las bases de la conexión entre ATM y ATR en respuesta a radiación ionizante.
- Estudio del reclutamiento de ATR a la cromatina y su dependencia de ATM.

### 2. Evaluar la respuesta al daño en el ADN en células con una cromatina “abierta”

- Evaluar la resistencia a los DSB
- Evaluar la capacidad de activación de la DDR
- Evaluar el reclutamiento de las proteínas de la DDR a las rupturas

### 3. Estudiar la función de la compactación de la cromatina *in vivo* mediante la eliminación de la proteína compactadora de la cromatina L3MBTL1

- Estudiar la localización celular y dinámica de L3MBTL1 en respuesta a daño en el ADN
- Evaluar la DDR en ausencia de L3MBTL1
- Eliminar genéticamente L3MBTL1 en un modelo murino para estudiar la predisposición a cáncer y el envejecimiento
- Estudiar las bases de la compactación de la cromatina por L3MBTL1 *in vivo*. Determinar si L3MBTL1 es un compactador global o local de la cromatina.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cultivos celulares

#### 1.1 Líneas celulares

Para estudiar la conexión entre las rutas de señalización de ATM y ATR se emplearon las líneas celulares humanas Raji y ATR<sup>lox/-</sup> adquiridas en la *American Type Culture Collection*. La línea Raji (CCL-86), silvestre para ATR y ATM, es una línea linfoblastoide y la línea ATR<sup>lox/-</sup> (CRL-2780) es una línea epitelial de cáncer de colon. También se usaron las líneas: ATR-silvestre (GM12072), ATR-Seckel (GM18366), fibroblastos humanos de pulmón ATM-salvajes (GM00367) y fibroblastos de piel AT (Ataxia Telangiectasia) (GM09607) adquiridas en *Coriell Cell Repositories*. Además, se emplearon otras dos líneas linfoblastoides: una silvestre para ATM y otra AT proporcionadas por el Dr Y. Shiloh (Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel). Todas las líneas celulares se crecieron en medio DMEM (4.5g/L Glucosa ; L-Glutamina) (Lonza, Switzerland) con 10% de suero bovino fetal (FBS) (South American Origin, Lonza) inactivado y penicilina/estreptomicina (Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA).

Las células madre deficientes en histonas H1c, H1d y H1e fueron generadas en el laboratorio del Dr. Skoultschi (Fan et al. 2005). Se usaron dos parejas de estas líneas celulares (F18 (H1<sup>+/+</sup>) y F9 (H1<sup>50</sup>)) y (F4 (H1<sup>+/+</sup>) y F1 (H1<sup>50</sup>)) en pase 10-12. La reconstitución parcial en células H1<sup>50</sup> con H1 exógena (células H1<sup>50/rec</sup>) se realizó por co-transfección de 10 µg de un plásmido que expresa la isoforma H1d fusionada a HA y 100 ng de pcDNA6/TR (Invitrogen, Grand Island, NY) en 5x10<sup>6</sup> de células H1<sup>50</sup> usando el kit de nucleofección para células madre embrionarias de Amaxa. Dos días después de la transfección se comenzó la selección con blasticidina 10 µg/ml y se aislaron colonias individuales 11 días después. Los clones se crecieron en presencia de blasticidina y fueron analizados por *Western blot* para detectar HA y por HPLC (Fan et al. 2005) para cuantificar el nivel de H1d exógena.

Las células MCF7 con niveles elevados de H1 se generaron por transfección transitoria de H1-GFP (proporcionada por el Dr. T. Misteli) en la línea celular MCF7 de cáncer de mama usando lipofectamina 2000 (Invitrogen). 24 horas después de la transfección, se plaquearon las células en placas de 96 pocillos con fondo plano de cristal (Greiner Bio-One) para su irradiación y posterior tinción y análisis por microscopía de alto rendimiento.

Para la generación de células MCF7 con un único DSB, se generaron virus productores de I-SceI en células 293T mediante co-transfección de PMXPIE-I-SceI (proporcionado por el Dr. A. Nussenzweig) y pCIeco usando lipofectamina y según los protocolos estándares. Con el sobrenadante retroviral se transdujo una línea celular MCF7 que contiene un único sitio de corte para la enzima de restricción I-SceI (proporcionada por el Dr. K.K. Khanna). Dos días después de

la infección, el 60% de las células presentaba un único DSB (visualizado como un único foco de 53BP1).

Las células HeLa con altos niveles de expresión de L3MBTL1-GFP se generaron por transfección estable con lipofectamina utilizando un plásmido pDEST3.1GFP en el que se había clonado previamente el cDNA de L3MBTL1 humana (BC039820). Dos días después de la transfección, se comenzó la selección con puromicina. Para obtener células con altos niveles de expresión de L3MBTL1-GFP, poblaciones con altos niveles de GFP fueron aisladas con un separador (sorter) FACS Aria de Becton Dickinson. Se obtuvieron poblaciones clonales por dilución límite a partir de esta separación.

### Condiciones de cultivo

Las células se mantuvieron en incubadores a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células madre embrionarias de ratón se mantuvieron en cultivo sobre gelatina o sobre *feeders* en medio DMEM Knock-Out (Gibco, Invitrogen) suplementado con 15% de FBS, penicilina/estreptomicina (Gibco, Invitrogen), 2 mM de glutamina (Gibco, Invitrogen), aminoácidos no esenciales (Lonza), 100 µM de β-mercaptoetanol (Gibco, Invitrogen) y 60 µl de LIF (ESGRO, Millipore, Billerica, MA, 10<sup>6</sup> U/ml) por 500 ml de DMEM.

Los linfocitos B primarios se mantuvieron en cultivo en medio RPMI (Euroclone) suplementado con 10% de FBS, penicilina/estreptomicina (Gibco, Invitrogen), 2 mM de glutamina (Gibco, Invitrogen), aminoácidos no esenciales (Lonza), piruvato sódico (Gibco, Invitrogen), 50 µM de β-mercaptoetanol (Gibco, Invitrogen) y 10 mM de Hepes (Lonza) al que se añadió 25 µg/ml de lipopolisacárido (LPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para la inducción de las células.

## 1.2 Infecciones adenovirales y retrovirales

Las células ATR<sup>lox/-</sup> fueron infectadas con Adenovirus Adeno-Cre CVL en medio DMEM sin suplementar durante 3-4 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se remplazaron los virus por DMEM suplementado y se incubaron las células durante 3 días. Los niveles de ATR se evaluaron por *Western blot*.

Para los experimentos de reducción de L3MBTL1 en células HeLa y BJ, se cotransfectaron células 293T con los vectores lentivirales shRNAs desarrollados por Sigma (Lentiviral Mission shRNA plasmids NM\_015478) y los plásmidos pΔ9.8 y pVsVg en una proporción 10: 7.5: 5. El vehículo de transducción fue lipofectamina. Se generó sobrenadante viral a partir de las 293T durante las 48 horas siguientes. Una vez filtrado, para eliminar los restos celulares, y suplementado



con 8 µg/ml de polibreno, se incubaron con él las células HeLa y BJ durante 8 horas. Transcurridas 36-48 horas tras la infección, comenzó la selección con puromicina.

### 1.3 Análisis del ciclo celular

#### Proliferación por incorporación de BrdU

Para analizar la proliferación de células H1<sup>+/+</sup> y H1<sup>50</sup> se incubaron las células durante 2 horas con 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) (BD Pharmingen). Se fijaron las células con 70% de etanol en PBS frío y el ADN fue desnaturalizado con una solución de 2 M de HCl y 0.5% de Tritón X-100. De esta forma el BrdU incorporado se expone y puede ser marcado con un anticuerpo monoclonal anti-BrdU-FITC (BD Pharmingen), incubado en un tampón de 1% de BSA (Albúmina sérica bovina) (BSA fraction V, Hoffmann-La Roche Inc, Nutley, NJ) y 0.5% de Tween20 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendieron las células en una solución de 1% de BSA, 10 µg/ml de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) y 100 µg/ml de RNasa (Qiagen) en PBS, se incubaron durante 30 minutos a 37°C o toda la noche a 4°C y después se analizó el perfil de ciclo celular y la incorporación de BrdU en un citómetro BD FACSCanto II (BD Biosciences) usando un láser de 488nm y los detectores 530/30-Blue para medir Alexa488, y 585/42-Blue para yoduro de propidio. Los datos se analizaron con el programa BD FACSDiva.

#### Análisis de las mitosis

Para analizar la progresión de la mitosis en células HeLa deficientes en L3MBTL1 (HeLa shARNL3MBTL1, y su control HeLa shARNcontrol) se fijaron las células con una solución de 2% paraformaldehído y 0.5% Tritón X-100 en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se permeabilizaron con una solución de 0.2% Tritón X-100. Se incubaron con los anticuerpos primarios  $\alpha$ -tubulina (Sigma-Aldrich) a la dilución 1/500 y Crest (suero de pacientes) a la dilución 1/50 durante una hora a temperatura ambiente y tras los lavados, se incubaron con los anticuerpos secundarios durante una hora. Se contaron entre 100 y 200 mitosis en dos experimentos independientes.

### 1.4 Curvas de crecimiento (protocolo 3T3)

Para la obtención de curvas de crecimiento de células ES, se plaquearon  $2.5 \times 10^5$  células en una placa de 35 mm<sup>2</sup>, 2 días después se contaron y se plaqueó de nuevo el mismo número de células (protocolo 3T3) (Todaro et al. 1963). El incremento de PDL (*population doublings*) se calculó aplicando la fórmula  $\Delta PDL = \log(n_f / n_0) / \log 2$ , donde  $n_0$  es el número inicial de células y  $n_f$  es el número final de células en cada pase.

### 1.5 Purificación y cultivo de linfocitos B primarios de ratón

Se disgregó el bazo en condiciones de esterilidad en una solución de lavado, compuesta por PBS y 1% de BSA (BSA Fraction V, Roche), se centrifugaron las células y posteriormente se lisaron los eritrocitos en una solución hipotónica (ACK Lysing Buffer, Lonza) durante 5 minutos. Se inactivó la lisis añadiendo solución de lavado y se eliminaron los agregados de células filtrando la suspensión celular a través de un filtro de 40  $\mu\text{m}$ . Tras su centrifugación, se resuspendieron las células en 900  $\mu\text{l}$  de solución de lavado y se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de esferas magnéticas conjugadas a anticuerpo anti-CD19 de ratón (Mouse CD19 MicroBeads, Miltenyi Biotech, Germany), se procedió a su incubación durante 15 minutos en frío. Posteriormente, se lavaron las células para eliminar el exceso de esferas y se resuspendieron en 1 ml de solución de lavado. La suspensión celular se cargó en una columna separadora (MS Columns, Miltenyi) colocada en un soporte magnético (OctoMACS separator, Miltenyi) donde entró por gravedad. La aplicación de un campo magnético permite separar las células unidas a las esferas. Después de unos lavados, se eluyeron las células B retenidas en la columna fuera del campo magnético con solución de lavado y se procedió a su conteo.

Los linfocitos B primarios se mantuvieron en cultivo a razón de  $1.2 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI suplementado (tal y como se ha descrito en el apartado anterior) al que se añadió 25  $\mu\text{g/ml}$  de LPS. Todos los experimentos, excepto el estudio de *class switch recombination* (CSR), se realizaron tras 2 días de estimulación en estas condiciones. La evaluación de CSR se realizó tras 3 y 4 días de estimulación con 25  $\mu\text{g/ml}$  de LPS y 5 ng/ml de interleuquina 4 murina recombinante (Peprotech) y en este caso se cultivaron los linfocitos a razón de  $2.5 \times 10^5$  células/ml.

## 2. Generación del modelo murino de pérdida condicional de función de L3MBTL1

La construcción génica para la generación del ratón fue encargada a la compañía Gene Bridges (Gene Bridges, Dresden, Germany). Brevemente, para la generación de la construcción se procedió de la siguiente manera: se subclonó el fragmento de interés del gen L3MBTL1 a partir de un BAC en un vector mínimo llamado pMV (contiene un origen de replicación ColE1 y una secuencia de resistencia a ampicilina) y posteriormente se insertó el fragmento loxP-FRT-PGK-neo-FRT y una secuencia loxP adicional por tecnología de recombinación Red/ET (o triple recombinación). Por último, se comprobó la integridad de las regiones funcionales de interés por secuenciación. La construcción generada contiene un *cassette* de resistencia a neomicina entre dos secuencias FRT, que permitirán su eliminación si se expresa una recombinasa flipasa, y dos secuencias loxP

flanqueando los exones 10 y 11 del gen L3MBTL1. Todos estos sitios de recombinación están insertados en regiones no codificantes del gen. Bajo la expresión de una recombinasa Cre se producirá la recombinación entre los dos sitios loxP y la consecuente eliminación de los exones 10 y 11.

Se linearizó el vector por digestión con la enzima *NotI* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) y fue electroporado en células madre embrionarias de ratón por la Unidad de Transgénicos del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. La construcción se integró en las células por recombinación homóloga gracias a que el vector contiene unas regiones de homología de 7 kb a ambos lados de la construcción. Los clones recombinantes se seleccionaron en presencia de neomicina y se procedió al análisis de éstos mediante *Southern blot* empleando sondas externas al vector diana en los extremos 5' y 3'. El clon recombinante que se empleó para generar quimeras ESBM2.32 fue agregado en mórulas de ratón CD1. Dichas quimeras fueron posteriormente cruzadas con animales silvestres. De estos cruces se obtuvieron animales heterocigotos para el alelo recombinante que fueron cruzados entre ellos para generar animales homocigotos.

### 3. Mantenimiento y genotipaje de los ratones

El genotipaje de los ratones se hizo de manera rutinaria por extracción de ADN de las colas de los ratones y PCR basada en el diseño de oligonucleótidos que nos permitió en cada caso un diagnóstico diferencial del genotipo de los ratones.

Para el genotipaje del *locus* correspondiente a L3MBTL1 se utilizaron los siguientes *primers*:

Fwa: 5'-GCTGGCTGGTTTGAGAAGAC-3'

Fwb: 5'-CTGTCCATCTGCACGAGACT-3'

Rvc: 5'-GAAGGAACAGAGCACCTTGC-3'

La combinación Fwa/Rvc amplifica una banda de 348 pb correspondiente al alelo silvestre (*wt*) mientras que la combinación Fwb/Fwc amplifica una banda de 528 pb correspondiente al alelo mutado (*lox*) ya que Fwb se diseñó en el *cassette* de neomicina. En aquellos ratones donde se eliminó el *cassette* de neomicina se genera una banda de 421 pb por la amplificación de la región entre Fwa y Rvc pero faltando en ésta la secuencia de la neomicina.

Para el genotipaje del *knock-in* CD19-Cre se utilizaron los *primers*:

CD19f\_22B5 5'-AGGGAGGCAATGTTGTGCT-3'

CD19r\_22B6 5'-TGCCAGACCAAAGAACTTCCTC-3'

CreR\_6B3            5'-GTTCGAACGCTAGAGCCTGTTT-3'

La combinación 22B5/22B6 genera una banda de 340 pb correspondiente al alelo wt del *locus* CD19 mientras que la combinación 22B5/6B3 amplificaba el alelo *knock-in* CD19Cre generando una banda de 520 pb.

Para el genotipaje del transgénico Cre se utilizaron los siguientes *primers*:

CreF\_6B2 5'-ACGAGTGATGAGGTTTCGCAAG-3'

CreR\_14B9            5'-CCCACCGTCAGTACGTGAGATA-3'

Y como control de integridad:

TshbF\_14B2            5'-CTACATGAGCAGGCAGACTGGA-3'

TshbR\_14B3            5'-AATGGACGGGCTGCTTCTATC-3'

La combinación 6B2/14B9 amplifica la secuencia Cre generando una banda de 520 pb y los *primers* 14B2/14B3 cargados en la misma reacción de PCR pero en menor cantidad amplifican 650 pb de Tshb (gen control).

Todos los animales usados durante el desarrollo de esta Tesis se mantuvieron en el animalario del Centro de Investigaciones Oncológicas de acuerdo con la ley de protección animal española (RD1201/2005) y la directiva europea (86/609/CEE) establecidas para regular los estándares de mantenimiento animal.

## 4. Análisis de ADN

### 4.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN de las distintas muestras empleadas en este trabajo se realizó mediante digestión de las células con una solución de lisis conteniendo 100 mM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8, 10 mM de EDTA, 0.5% de SDS y 400 µg/ml de proteinasa K (Roche) durante 12 horas a 55°C. Tras el tratamiento de los lisados celulares con una solución saturada de NaCl, el ADN se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en agua destilada.

### 4.2 PCR

Las PCRs de este trabajo se realizaron en un volumen de 20 µl, siendo la composición de la mezcla de reacción la siguiente: 200 µM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de tampón de reacción 10X, 0.2 µl de taq polimerasa (Platinum Taq, Invitrogen), 1 µM de cada *primer* y 100 ng de ADN molde.

### 4.3 Southern Blot

Se digirieron aproximadamente 15 µg de ADN genómico con las enzimas de digestión requeridas durante 12 horas a 37°C en una solución que contenía tampón de digestión 1X (Buffer 2, New England Biolabs), 1 mM de espermidina y 0.1 mg/ml de BSA. Para analizar la inserción por recombinación homóloga de nuestra construcción en el extremo 5' se requirió la digestión con las enzimas *EcoRV* y *NdeI*, mientras que para el extremo 3' se digirió con la enzima de restricción *AflIII*, todas ellas de New England Biolabs. El material digerido se separó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% a bajo voltaje y durante un tiempo suficiente para que el *smear* de ADN se extendiera a lo largo del gel. Posteriormente se desnaturalizó el gel incubándolo en primer lugar en una solución de 0.25 M de HCl durante 15 minutos, se hizo un lavado con agua destilada, y se trató en segundo lugar durante 45 minutos con una solución desnaturalizante compuesta por 0.4 M de NaOH y 0.6 M de NaCl. Tras un aclarado con agua destilada, finalmente se trató el gel con una solución neutralizante de 0.5 M de Tris-HCl pH 7.5 y 1.5 M de NaCl durante 30 minutos. Todos los tratamientos se llevaron a cabo a temperatura ambiente en agitación suave.

El ADN se transfirió mediante difusión en SSC 10X a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond XL, Amersham, Buckinghamshire, UK) durante un mínimo de 12 horas. Después, se favoreció la unión covalente del ADN a la membrana tratándola bajo luz ultravioleta con un aparato *Stratalinker* (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

La membrana se prehibridó con solución de hibridación a 42°C durante un mínimo de dos horas. La solución de hibridación se preparó disolviendo en 500 ml de agua y con calor: 3.35 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.15 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 52.5 g de NaCl, 5 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0, 5 ml de esperma de salmón, 0.8 g de polivinilpirrolidona (Sigma-Aldrich), 0.8 g de Ficoll 40, 10 g de SDS y 50 g de Dextran sulfato (Sigma-Aldrich), y posteriormente se añadieron 500 ml de formamida. Durante la prehibridación se procedió al marcaje radioactivo de la sonda. Para ello se disolvieron 20 ng de sonda en un volumen final de 45 µl de TE, la sonda se desnaturalizó a 99°C, se amplificó según las instrucciones del sistema Rediprime II con 50 µCi de [32P] dCTP y se purificó mediante filtración en una columna de Sephadex G-50 (ProbeQuant GE Healthcare). Se hibridó la membrana con la sonda a 42°C durante toda la noche en solución de hibridación. Una vez concluida la hibridación, la membrana se lavó dos veces con una solución de 0.1% de SDS y SSC 1X a 42°C durante 20 minutos y el tercer lavado se realizó en una solución de 0.1% SDS y SSC 0.2X a 55°C durante 30 minutos. Tras los lavados se expuso la membrana en un *cassette* de exposición con una pantalla de detección PhosphorImager durante el tiempo conveniente y se reveló el resultado con un escáner Typhoon TRIO (GE Healthcare).

Las sondas para el análisis de la recombinación homóloga por ambos lados se generaron a partir de ADN genómico con los *primers* siguientes:

Sonda 5'	Fw B	5'-CCCTGTTGTTTGGATGTGTG-3'
	Rv B	5'-GCCCTGTAGCTGGTATCCTG-3'
Sonda 3'	Fw A	5'-GGAGACCATGGCTGTCAGTT-3'
	Rv A	5'-GACCAGTAGCAGGGATGAGC-3'

#### 4.4 Ensayo de cometa

El ensayo de cometa se realizó con un *kit* específico (Trevigen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esencialmente, las células fueron diluidas en agarosa de bajo punto de fusión y se les aplicó un voltaje bajo durante una hora para extraer el ADN fragmentado de la célula. Posteriormente, se tiñó el gel de agarosa con Sybr-green y se fotografió en un microscopio de fluorescencia. La cuantificación del ensayo se llevó a cabo con un programa específico mediante el cual se identificaron manualmente parámetros morfológicos de la célula que definen la proporción de ADN intracelular y extracelular.

## 5. Análisis de ARN

### 5.1 Extracción de ARN

En el caso de células que crecen en suspensión, éstas se recogieron y centrifugaron, y se añadió al *pellet* de células ( $5-10 \times 10^6$  células) 1 ml del reactivo TRIzol (Invitrogen) para su lisis. En el caso de células adherentes, se retiró el medio de cultivo y se añadió 1 ml de TRIzol directamente a la placa de cultivo de  $10 \text{ cm}^2$ . Se homogeneizó la suspensión por pipeteos sucesivos y se incubó la lisis durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se procedió entonces a la extracción orgánica. Se añadieron 0.4 volúmenes de cloroformo y, después de agitar enérgicamente la muestra durante 15 segundos, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, se centrifugó 15 minutos a 12000 g en una microcentrífuga para favorecer la separación de ambas fases. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se añadió lentamente a la muestra 1 volumen de etanol al 70%.

A continuación, se realizó una purificación cromatográfica de la muestra utilizando el *kit* comercial RNeasy midi (Qiagen) que comprende un tratamiento de la muestra con DNasa. La muestra se eluyó con agua libre de RNasas y se guardó a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su análisis de calidad.

### 5.2 Micromatrices de ADN (*microarrays*)

Para analizar la expresión génica se extrajo el ARN como se ha descrito previamente y se evaluó su calidad con el sistema BioAnalyzer (Agilent). Se marcó y amplificó 1  $\mu\text{g}$  de la muestra o

de la muestra de referencia con Cy5 y Cy3 mediante *Low RNA Input Linear Amplification kit* (Agilent). Las hibridaciones se realizaron en micromatrices de expresión Agilent 4x44K Expression Arrays a 65°C durante 17 horas usando los kits Gene Expression Hybridization y Wash Buffer (Agilent). Tras los lavados, se escanearon las muestras mediante un escáner Agilent G2565C. Las imágenes se analizaron con el programa Agilent Feature Extraction Software (10.1.1). La evaluación de la calidad del ARN así como las hibridaciones fueron realizadas por el Servicio de Genómica del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.

### 5.3 RT-PCR cuantitativa

Los niveles de ARN de L3MBTL1 en células HeLa y BJ fueron analizados por retrotranscripción inversa cuantitativa. Se empleó 0.6 µg de ARN de cada muestra en una mezcla de reacción de acuerdo con el kit SuperScript III Platinum (Invitrogen) que contiene Sybr-green. La curva se normalizó con la curva de niveles de GAPDH para cada muestra. Los primers empleados fueron:

Fw human L3MBTL1	5'-CCCTCCGAAGTATCGAAAGA-3'
Rv human L3MBTL1	5'-TTGGTCCTCACAACCTGTCA-3'
Fw GAPDH	5'-GCCACCCAGAAGACTGTGGATGGC-3'
Rv GAPDH	5'-CATGATGGCCATGAGGTCCACCAC-3'

## 6. Análisis de proteínas

### 6.1 Extracción de proteínas y Western blot

Los extractos de proteínas se obtuvieron por lisis de las células sobre hielo durante 15 minutos con solución RIPA (50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 1% de NP-40, 0.25% de Na-deoxycolate, 150 mM de NaCl y 1 mM de EDTA) suplementada con inhibidores de proteasas (1 mM de PMSF; 1 µg/ml de aprotinina, leupeptina y pepstatina y 1 mM de NaF) y de fosfatasas (*cocktail* de inhibidores de fosfatasas I, Sigma-Aldrich) y su posterior centrifugación a 16000 g para eliminar los restos celulares. Se determinó la concentración de proteína mediante el método Bradford.

Se separaron entre 30 y 40 µg de proteína de cada muestra en geles de gradiente 4-12% SDS-PAGE (Tris-Acetate Nupage Novex, Invitrogen), desnaturalizando previamente las proteínas por incubación a 99°C durante 5 minutos y las proteínas se transfirieron posteriormente a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL Nitrocellulose, Amersham) por transferencia húmeda.

Las membranas se bloquearon de forma estándar con solución de bloqueo compuesta por TBS con 0.1% de Tween20 (TBS-T) y 5% de leche (Central Lechera Asturiana) durante 1 hora a

temperatura ambiente. Se procedió a la incubación de las membranas con los anticuerpos primarios durante una hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C en solución de bloqueo y tras tres lavados de 10 minutos con TBS-T se incubaron las membranas por segunda vez con anticuerpos secundarios conjugados a un fluoróforo durante una hora a temperatura ambiente. La visualización de las proteínas se realizó con un escáner Li-cor (BD Biosciences) que permite una adquisición digital lineal para análisis cuantitativos.

### 6.2 Aislamiento y visualización de las proteínas unidas a la cromatina (*chromatin bound fractionation*)

Se incubaron  $10^7$  células en 150  $\mu$ l de un tampón de fraccionamiento (50 mM de Hepes pH 7.5; 150 mM de NaCl; 1 mM de EDTA) con 0.04% de Nonidet P-40 e inhibidores de proteasas (1mM de PMSF; 1 $\mu$ g/ml de aprotinina, leupeptina y pepstatina y 1mM de NaF) y de fosfatasas (*cocktail* de inhibidores de fosfatasas I, Sigma-Aldrich) a 4°C durante 5 minutos. Tras su centrifugación, se recogió el sobrenadante (fracción I) y se lavó el *pellet* que contenía los núcleos celulares dos veces con el mismo tampón de fraccionamiento. Posteriormente se extrajo la proteína nuclear incubando los *pellets* nucleares durante 40 minutos en hielo usando un segundo tampón de fraccionamiento que contenía una concentración mayor de Nonidet P-40 (0.5%) y suplementado igualmente con inhibidores de proteasas y fosfatasas (fracción II). La fracción unida a la cromatina (fracción III) se obtuvo por centrifugación de esta segunda muestra a 16000 g durante 15 minutos.

Se procedió a la separación de alícuotas de cada una de las fracciones por *Western blot*. La incubación de las membranas con los siguientes anticuerpos primarios se realizó durante toda la noche a 4°C en solución de bloqueo: ATM-1981<sup>P</sup> (Rockland Immunochemicals, Inc.), ATR (Novus Biologicals, Littleton, CO), ATR (Serotec, Germany), Chk2 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), Chk1 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK),  $\beta$ -actina (Sigma-Aldrich), Chk2-T68<sup>P</sup>, y Chk1-S345<sup>P</sup> (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Como control de fraccionamiento se empleó un anticuerpo contra el factor nuclear Orc2 (proporcionado por el Dr. Méndez, CNIO). Los niveles de proteína fueron visualizados utilizando anticuerpos secundarios conjugados con HRP y el reactivo ECL (Amersham, UK) usando distintos tiempos de incubación en función del anticuerpo.

### 6.3 Inmunofluorescencia convencional

Las células fueron plaqueadas en placas de cultivo sobre cubreobjetos tratados previamente con 0.1% de gelatina. Tras tratar las células con los reactivos correspondientes, se fijaron con 2% de paraformaldehído en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con



PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos y se permeabilizaron las células con una solución de 0.1% de citrato sódico y 0.1% de Tritón X-100 durante 5 minutos. A esto le siguieron dos lavados más con PBS y dos lavados de 5 minutos con una solución de lavado compuesta por 0.25% BSA y 0.1% Tween20 en PBS. Se bloquearon las células con 2.5% BSA, 0.1% Tween20 y 10% de suero de cabra en PBS durante 30 minutos. Se realizó la incubación con el anticuerpo primario correspondiente en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C y tras 3 lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con solución de lavado se incubaron los cristales con el anticuerpo secundario anti-ratón, anti-conejo o anti-cabra conjugado a un fluoróforo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó el anticuerpo secundario de la misma manera y se tiñeron los núcleos con una solución que contenía DAPI (Sigma-Aldrich) durante 1 minuto para proceder al lavado de las células posteriormente y montar los cristales con medio de montaje sobre portaobjetos para la visualización de las muestras en un microscopio de fluorescencia Zeiss Imager Z1 con tecnología Apotome y cámara Orca 1394 (Hamamatsu).

#### 6.4 Inmunofluorescencia de alto rendimiento

Para inmunofluorescencia de alto rendimiento (*High Throughput Microscopy* o HTM) se cultivaron las células en placas de 96 pocillos con fondo plano de cristal (Greiner Bio-One). Se utilizaron los mismos protocolos de tinción que en inmunofluorescencia convencional, salvo que las preparaciones se dejaron en PBS en lugar de medio de montaje. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio de lectura automatizada, BD Pathway 855 BioImager (Beckton Dickinson) a temperatura ambiente y empleando un objetivo seco de 20 aumentos. El análisis de imagen y cuantificación de la señal de fluorescencia se realizó con el software AttoVision (Beckton Dickinson).

El método que permite la adquisición de imágenes de forma automatizada y su posterior análisis se describe brevemente a continuación. El microscopio robotizado captura imágenes en diferentes puntos de una placa, de 96 pocillos en este caso, en distintos canales de fluorescencia según una matriz personalizable. Una vez adquiridas las imágenes, el software de análisis permite delimitar regiones de interés en función de parámetros visuales que se identifican como objetos individuales. En nuestro caso, cada núcleo es reconocido por el contraste de intensidad de la tinción del ADN con DAPI respecto al fondo de la imagen. De esta forma se define una máscara de objetos que nos sirve para filtrar las imágenes capturadas en todos los canales, pudiéndose analizar la parámetros dentro de esos objetos, como puede ser la intensidad de fluorescencia dentro del núcleo. Se genera una lista de todos los objetos (núcleos) y los parámetros analizados. Éstos se pueden representar en una gráfica directamente, atribuyendo un punto a cada objeto, o indirectamente a través de la media para cada tratamiento o condición. Se pueden hacer análisis más complejos

como la identificación de objetos dentro de otros objetos: esta tecnología permite delimitar objetos en función de la tinción (definimos los núcleos como aquello teñido con DAPI), filtrar con estos objetos otro canal y dentro de ellos buscar otros más pequeños (por ejemplo, focos de la proteína 53BP1 teñidos con Alexa-488). Así se puede determinar cuántos focos de 53BP1 existen por núcleo e incluso analizar características como su tamaño.

### 6.5 Análisis de la dinámica de proteínas por FRAP (recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo)

Se plaquearon células HeLa monoclonales con niveles altos de expresión de L3MBTL1-GFP un día antes de la realización del experimento en placas de 35 mm<sup>2</sup> con fondo de cristal a razón de 2.5x10<sup>5</sup> células por placa. Los experimentos de fotoblanqueo se realizaron en una cámara a 37°C. Se seleccionó una región de 9 μm<sup>2</sup> y se realizaron 3 capturas de pre-blanqueo, 5 exposiciones de blanqueo y 50 capturas de post-blanqueo en cada núcleo analizado. Medimos la recuperación de la señal fluorescente usando la media de intensidad de fluorescencia de esta área normalizándola con la intensidad de fluorescencia de una región control dentro del mismo núcleo. Se dividió el valor de fluorescencia en la región de interés (ROI, *región of interest*) para cada tiempo por la fluorescencia en la región control para obtener un valor de fluorescencia relativo. Después, los datos se normalizaron a 100% con los valores de fluorescencia antes del fotoblanqueo. El experimento se realizó en un microscopio Leica TCS-SP5 (AOBS) con un objetivo 63X de aceite de inmersión con una apertura numérica de 1.4.

### 6.6 Citometría de flujo de los eventos fosforilados por daño en el ADN

El protocolo empleado es una variación de un método usado para la evaluación del estado de fosforilación de epítomos por citometría de flujo (Perez et al. 2004). Se fijaron 5x10<sup>5</sup> células añadiendo directamente formaldehído al medio de cultivo de forma que quedara a una concentración de 1.5%. Se fijaron las células durante 10 minutos a temperatura ambiente y se recogieron por centrifugación. Tras esto, se permeabilizaron las células resuspendiéndolas con ayuda de un *vortex* en 500 μl de metanol frío y se incubaron a 4°C durante 10 minutos. Posteriormente, se lavaron las células dos veces con solución de bloqueo de 1% de BSA en PBS y se resuspendieron en solución de bloqueo conteniendo el anticuerpo primario Chk2-T68<sup>P</sup> o Chk1-S345<sup>P</sup> (Cell Signaling Technology), se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar las células y repetir el proceso con el anticuerpo secundario conjugado a AlexaFluor488 (Molecular Probes, Invitrogen), se resuspendieron finalmente las células en solución de bloqueo con 10 μg/ml de yoduro de propidio y 100 μg/ml de RNAsa y se incubaron

durante 30 minutos a 37°C o toda la noche a 4°C. La citometría de flujo se evaluó en un FACScanner (Becton Dickinson).

## 6.7 Anticuerpos empleados

Además de los anticuerpos citados en el apartado 6.2, en esta Tesis se han empleado los siguientes anticuerpos primarios: H2AX (Abcam, Cambridge, MA),  $\gamma$ -H2AX (Upstate Biotechnology), H4K20me1 (Upstate), H3 (Abcam), H3-S10<sup>P</sup> (Upstate),  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich), 53BP1 (Novus Biologicals), GFP (Roche), L3MBTL1 (LPBio), RPA32 (Abcam), RPA32(S4/S8)<sup>P</sup> (Bethyl). Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos Alexa 680 y Alexa 800 (Molecular Probes) para *Western blot* a una dilución 1/2000 y los anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos Alexa 488 y Alexa 594 para inmunofluorescencia (Molecular Probes) a una dilución 1/250.

## 7. Análisis de la DDR

### 7.1 Ensayo de supervivencia de colonias

Se plaquearon 600 células por pocillo de 35 mm<sup>2</sup> y se plaquearon 3 pocillos por condición experimental. Al día siguiente, se aplicaron los agentes genotóxicos y se cambió el medio a las células tras los tratamientos. Se mantuvieron las células en cultivos cambiando el medio de cultivo cada 3 días. 9 días después de tratar las células, se tiñeron las placas con azul de metileno y se procedió al conteo de las colonias.

### 7.2 Análisis de *checkpoints*

#### **Checkpoint intra-S**

El *checkpoint* intra-S se analizó tal y como describen A. Celeste y colaboradores en un trabajo de 2002 (Celeste et al. 2002). El análisis se basa en la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina durante un pulso de tiempo tras el tratamiento con el agente genotóxico (el nivel de incorporación en células dañadas se normaliza con el nivel de incorporación de timidina en células no dañadas). En el caso de MMS, las células se trataron durante 45 minutos antes del pulso.

#### **Checkpoint G2/M**

Las células en cultivo fueron dañadas con diferentes dosis de radiación gamma (0.1 Gy; 0.25 Gy; 0.5 Gy; 1 Gy; 2.5 Gy y 5 Gy) y tras 45 minutos en cultivo se recogieron y fijaron en frío con etanol al 70% en PBS. Posteriormente, células se permeabilizaron durante 15 minutos sobre hielo con 0.25% Tritón X-100 en PBS. Tras su centrifugación, las muestras (entre 5x10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> células) se

incubaron con 0,75 µg del anticuerpo primario que detecta la fosforilación en la serina 10 de la histona 3 (Upstate 06-570), marca epigenética de entrada en mitosis, disuelto en 1% de BSA en PBS (solución de bloqueo) durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las células con esta solución se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa488 diluido 1/200 en solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células y resuspendieron en solución de bloqueo con 10 µg/ml de yoduro de propidio y 100 µg/ml de RNAsa y se incubaron durante 30 minutos a 37°C o toda la noche a 4°C. Se analizó el perfil de ciclo celular y los eventos fosforilados en un citómetro BD FACSCanto II usando un láser de 488nm y los detectores 530/30-*Blue* para medir Alexa488 y 585/42-*Blue* para yoduro de propidio. Los datos se analizaron con el programa BD FACSDiva.

### 7.3 Generación de DSB de forma localizada con láser UV

Se plaquearon las células Hela L3MBTL1-GFP en placas de 35 mm<sup>2</sup> con fondo de cristal y se sensibilizaron durante 20 minutos a 37°C con 10 µg/ml del agente intercalante del ADN Hoescht 33258 (Sigma-Aldrich). Tras el lavado del reactivo, se montó la placa en un microscopio TCS-SP2 Leica en una cámara a 37°C y las células fueron irradiadas con un láser de 351 nm de longitud de onda a lo largo de un recorrido elegido para generar DSB localizados. Se empleó un objetivo 63X de inmersión en glicerol y apertura numérica 1.32. La captura de imágenes y las mediciones fueron realizadas tal y como se describe en el apartado de FRAP.

## 8. Análisis de linfocitos B primarios

### 8.1 Análisis de proliferación

Los linfocitos B recién aislados se trataron con el reactivo CFSE (CellTrace CFSE, Molecular Probes) antes de su puesta en cultivo. Para ello, se incubaron a razón de  $5 \times 10^6$  células/ml durante 20 minutos a 37°C en RPMI sin suero con 5 µM de CFSE. Tras unos lavados posteriores, los linfocitos se resuspendieron en su medio correspondiente y se mantuvieron en cultivo durante 3 y 4 días. El CFSE entra por difusión en la célula e interacciona con las aminos intracelulares formando aductos fluorescentes que se retienen en la célula, en las posteriores divisiones cada una de las células hija contendrá la mitad de CFSE que la célula de origen. La proliferación se analizó por citometría de flujo en un citómetro BD FACSCanto II con un láser de excitación de 488 nm y un detector 530/30-*Blue*. Los datos se analizaron con el programa BD FACSDiva.

## 8.2 Análisis de *class switch recombination*

Se mantuvieron en cultivo los linfocitos B primarios, previamente marcados con CFSE, a razón de  $2.5 \times 10^5$  células/ml, en condiciones de inducción de *class switch recombination*: medio RPMI suplementado y al que se añade 25 µg/ml de LPS y 5 ng/ml interleuquina 4 murina recombinante. Tras 3 o 4 días de inducción se recogieron las células y se bloquearon con una solución de 1% BSA en PBS durante 10 minutos. Todas las incubaciones se realizaron en frío y en oscuridad. Se centrifugaron las células y se incubaron con el anticuerpo primario unido a biotina anti-IgG1 (BD Pharmingen) diluido 1/100 en solución de bloqueo durante 30 minutos. Tras el marcaje con el anticuerpo primario, se centrifugaron las células y se lavaron con solución de bloqueo durante 5 minutos. Después, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario Streptavidina-APC diluido 1/100 (Molecular Probes) en solución de bloqueo durante 30 minutos. Se lavaron las células del mismo modo que después del anticuerpo primario y se resuspendieron en 250 µl de PBS con 1% BSA en tubos de citometría. El porcentaje de células que expresaban el isotipo IgG1 se analizó en un citómetro BD FACSCanto II usando un láser de 635nm y un detector 660/20-Red y se usó un láser de excitación de 488nm y detector 530/30-Blue para medir CFSE.



# RESULTADOS





## RESULTADOS

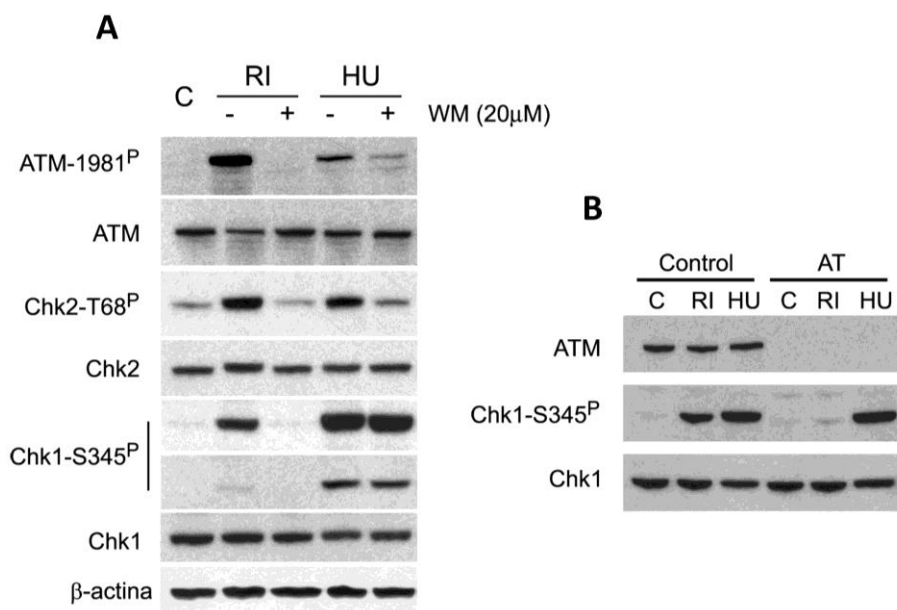
### 1. ATM regula la carga de ATR en la cromatina en respuesta a rupturas de doble cadena en el ADN generadas por radiación ionizante

A nivel molecular, las principales quinasas que activan la cascada de señalización ante DSB para el establecimiento de los *checkpoints* son ATM y ATR. Nuestro conocimiento hasta el momento de comenzar esta Tesis colocaba a ATM y ATR activando dos rutas independientes: por un lado, la respuesta a DSB inducidos por radiación ionizante estaría dirigida por ATM y por la fosforilación de su quinasa efectora específica de *checkpoints* Chk2, y por otro lado, ATR sería la encargada de señalar los DSB que se generan por colapso de las horquillas de replicación. Sin embargo, el análisis detallado de las consecuencias de la falta de ATM, ATR, Chk1 y Chk2 sobre el control de los *checkpoints* abre la posibilidad a que se estén produciendo otras interacciones. Mientras que la deficiencia en ATM hace que la célula pierda el control de todos los *checkpoints* en respuesta a radiación ionizante (Abraham 2001), las células Chk2 *knock-out* solo muestran un pequeño defecto en el establecimiento del *checkpoint* G1/S pero no en el *checkpoint* intra-S ni en el G2/M (Fernandez-Capetillo et al. 2002; Takai et al. 2002). Por otro lado, aunque la ruta ATR-Chk1 siempre se ha asociado exclusivamente con las rupturas que se generan durante la replicación, se ha visto que las dos quinasas son necesarias para la activación del *checkpoint* G2/M inducido por radiación ionizante (Brown et al. 2003; Liu et al. 2000). A esto hay que añadir que Chk1 se fosforila en células irradiadas, hecho que se había atribuido a la pérdida de especificidad de ATM cuando el daño generado es muy grande. Sin embargo, es ATR y no ATM la quinasa responsable de fosforilar a Chk1. Para aclarar esta cuestión, nos propusimos resolver qué quinasas controlan los *checkpoints* en respuesta a radiación ionizante.

#### 1.1 La fosforilación de Chk1 inducida por radiación ionizante depende de ATM y ATR

En un primer lugar, quisimos determinar la ruta molecular que es responsable de la fosforilación de Chk1 en respuesta a DSB o por agentes que generan estrés replicativo (ER) por la acumulación de ADN de cadena sencilla (ssDNA). Para ello, evaluamos la fosforilación de Chk1 en su serina 345 (Chk1-S345<sup>P</sup>) mediante *Western blot* en células tratadas con radiación ionizante (RI) o hidroximetilurea (HU). Realizamos el experimento en presencia o ausencia del inhibidor de PIKKs Wortmanina (WM) a una concentración que inhibe ATM pero no ATR (figura 8, A)

(Sarkaria et al. 1998). Validamos esta especificidad al observar cómo los niveles de fosforilación de Chk2 en su treonina 68 (Chk2-T68<sup>P</sup>), estrictamente dependientes de ATM (Ward et al. 2001), disminuyeron en presencia del inhibidor. Sin embargo, la fosforilación de Chk1 en respuesta a HU, que es estrictamente dependiente de ATR no se vio afectada a estas dosis de WM. En todos los experimentos, analizamos los niveles de ATM fosforilada en su residuo 1981 (ATM 1981<sup>P</sup>) como muestra de activación de ATM (Bakkenist et al. 2003).

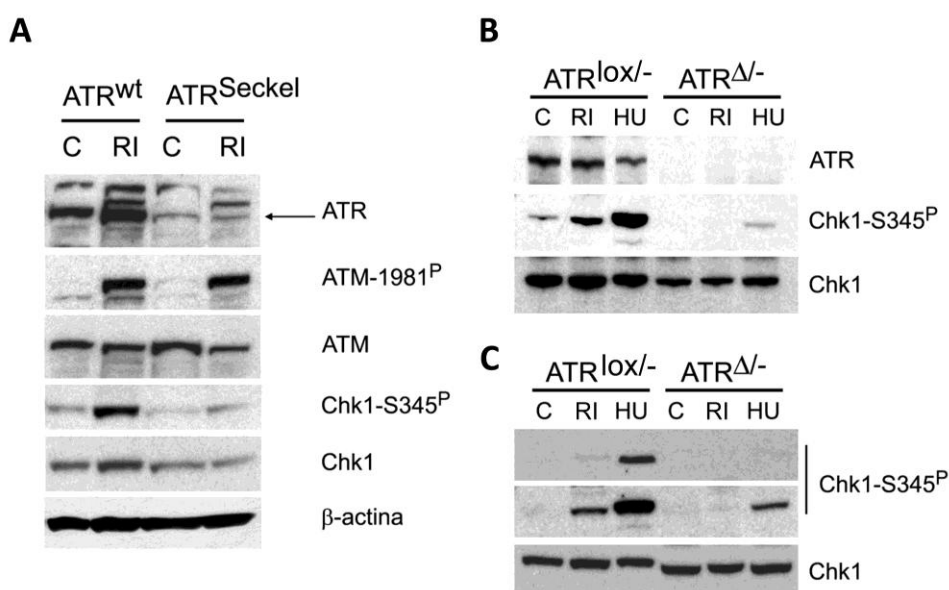


**Figura 8: Análisis de la activación de ATM, Chk1 y Chk2 en respuesta a daño en el ADN. Influencia de la inhibición de ATM (A)** Detección por *Western blot* de ATM-1981<sup>P</sup>, ATM, Chk2-T68<sup>P</sup>, Chk2, Chk1-S345<sup>P</sup> y Chk1 en células Raji linfoblastoides humanas expuestas a hidroximetilurea (HU) y radiación ionizante (RI). Para inhibir la actividad de ATM, se trataron las células 15 minutos con Wortmanina (WM) 20 μM antes de inducir daño en el ADN. **(B)** Evaluación de la dinámica de fosforilación de Chk1 en células humanas control y AT en respuesta a daño en el ADN.

Coherente con el modelo actual, observamos que, ante cualquier fuente de daño, Chk2 se fosforila y esta modificación depende de ATM. Chk1 se fosforila al tratar las células con HU pero también, aunque en menor medida, al generar rupturas con RI, hecho que ya se había observado en estudios anteriores. Al generar rupturas con HU, la fosforilación de Chk1 no se ve afectada por la actividad de ATM. Esto último es debido a que ATR es la quinasa que responde al exceso de ssDNA generado en las horquillas de replicación retenidas (Liu et al. 2000). Sin embargo, al generar rupturas en el ADN con radiación ionizante, la fosforilación de Chk1 desapareció en las células que fueron tratadas previamente con WM a una concentración que inhibe solo a ATM. Esta observación se confirmó con células deficientes en ATM procedentes de pacientes con ataxia telangiectasia (AT) donde no se observó fosforilación de Chk1 al irradiar pero sí tras tratarlas con

HU (figura 8, B). Los resultados implican que ATM regula la fosforilación de Chk1 en respuesta a radiación ionizante pero es dispensable para su fosforilación en respuesta a ER.

Puesto que ATR es la quinasa que fosforila a Chk1 en respuesta a ssDNA (Liu et al. 2000), decidimos explorar el papel de ATR en la fosforilación de Chk1 por radiación ionizante. Para ello, analizamos los niveles de fosforilación de Chk1 en una línea celular linfoblastoide generada a partir de linfocitos de pacientes con síndrome de Seckel que presentan niveles muy bajos de ATR (figura 9, A) (O'Driscoll et al. 2003). Mientras que en la línea linfoblastoide control se observó una rápida inducción de la fosforilación de Chk1 en respuesta a radiación ionizante, ésta no se detectó en las células de pacientes de Seckel. Esta dependencia de ATR ya se había observado en otro estudio que empleaba fibroblastos embrionarios de ratones *knock-out* condicionales para ATR (Brown et al. 2003). La activación de ATM por radiación ionizante no se vio afectada por los bajos niveles de ATR. Este dato era clave, ya que indica que la existencia de ATM activo no es suficiente para fosforilar a Chk1, sugiriendo que no lo hacía directamente. En resumen, los datos indican que la fosforilación de Chk1 en respuesta a DSB es llevada a cabo por ATR pero por un mecanismo controlado por ATM.



**Figura 9: Análisis de la dependencia de ATR en la activación Chk1 en respuesta a daño en el ADN.** (A) Análisis por *Western Blot* de los niveles de ATR, Chk1-S345<sup>P</sup>, Chk1, ATM-1981<sup>P</sup> y ATM en extractos de células humanas ATR control (ATR<sup>wt</sup>) e hipomorfas para ATR (ATR<sup>Seckel</sup>) irradiadas con 20 Gy (RI) y no irradiadas (C). (B) Análisis de la fosforilación de Chk1 en células ATR<sup>lox/-</sup> 48 horas después de la infección con adenovirus que expresan la recombinasa Cre (ATR<sup>Δ/-</sup>) y células ATR<sup>lox/-</sup> no infectadas. (C) Mismo análisis que en (B) pero con la carga normalizada para evitar las diferencias en los niveles de Chk1. En todos los casos las células en crecimiento exponencial fueron irradiadas con 20 Gy y los extractos preparados 45 minutos después o tratadas con HU 2 mM durante 2 horas.

Era necesario descartar la influencia que pudiese tener en el resultado la variabilidad entre las dos líneas linfoblastoides debida a los numerosos pases en cultivo. Con este objetivo, cotejamos los resultados empleando otra línea celular humana establecida. En esta línea, que contiene un alelo *knock-out* y un alelo condicional ( $ATR^{lox/-}$ ) para ATR, eliminamos ATR mediante infección con adenovirus que expresan la recombinasa Cre (figura 9, B) (Cortez et al. 2001). Los resultados obtenidos con las líneas linfoblastoides se repitieron en la línea celular condicional. Un dato interesante es que en ambas líneas celulares la disminución de ATR se acompañó de una bajada en los niveles totales de Chk1. Para estudiar la causa, analizamos el perfil de ciclo celular en las líneas humanas y observamos que éste no cambiaba significativamente al variar los niveles de ATR por lo que las diferencias en Chk1 total solo podían resultar de una regulación por parte de ATR de la cantidad de su quinasa efectora Chk1. Para apreciar mejor la magnitud del defecto en la fosforilación de Chk1 en ausencia de ATR, normalizamos la carga de los *Western blot* tomando como referencia los niveles totales de Chk1 de la línea  $ATR^{lox/-}$  y la línea  $ATR^{\Delta/-}$  (figura 9, C). Tras la normalización, pudimos confirmar que ATR controla la fosforilación de Chk1, que depende de ATM y ATR pero no es fosforilada directamente por ATM.

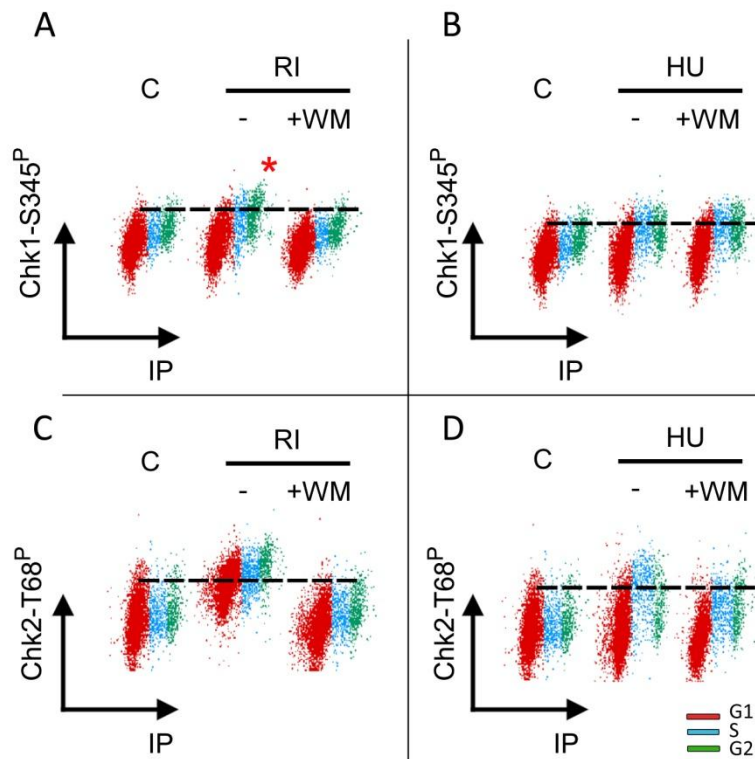
Estos primeros experimentos demostraron que mientras que la fosforilación de Chk1 en respuesta a ER depende estrictamente de ATR, la fosforilación de Chk1 en respuesta a radiación ionizante está regulada por la secuencia ordenada: ATM→ATR→Chk1.

### 1.2 La fosforilación de Chk1 y Chk2 en respuesta a daño en el ADN es específica de la fase del ciclo celular

Nos servimos de un protocolo de detección de fosfoepítpos por citometría de flujo (Perez et al. 2004) para diseñar un nuevo método de análisis de Chk1 y Chk2 fosforiladas en cada fase del ciclo. La figura 10 muestra los resultados obtenidos sobre la fosforilación de Chk1 y Chk2 con este método en respuesta a daño en el ADN durante el ciclo celular.

En respuesta a RI, Chk2-T68<sup>P</sup> aumenta en todas las fases del ciclo. En cambio, en respuesta a HU, la fosforilación de Chk2 se produce solo en células en fase S, de acuerdo con que la HU solo genera ssDNA en células replicando. Además, consistente con los *Western blots*, esta fosforilación por HU o RI se anula al pretratar las células con el inhibidor de ATM Wortmanina. Esto indica que la fosforilación de Chk2 por ATM se produce siempre que se detecta un DSB, independientemente de la fuente de daño y de la fase del ciclo. Al igual que Chk2, la fosforilación de Chk1 en respuesta a HU solo se produjo en células en fase replicativa. Sin embargo, observamos el mismo comportamiento de Chk1 en respuesta a RI con la diferencia de que la fosforilación era mayor en células en G2. Más aún, esta fosforilación de Chk1 con RI desapareció al inhibir la actividad de ATM. Este método nos muestra que la fosforilación de Chk1 en respuesta a DSB está restringida a

las fases S y G<sub>2</sub>, explicando porqué es únicamente en estas fases donde ejerce su función, y nos ofrece una visión clara de cómo las actividades de ATM y ATR están reguladas a lo largo del ciclo.



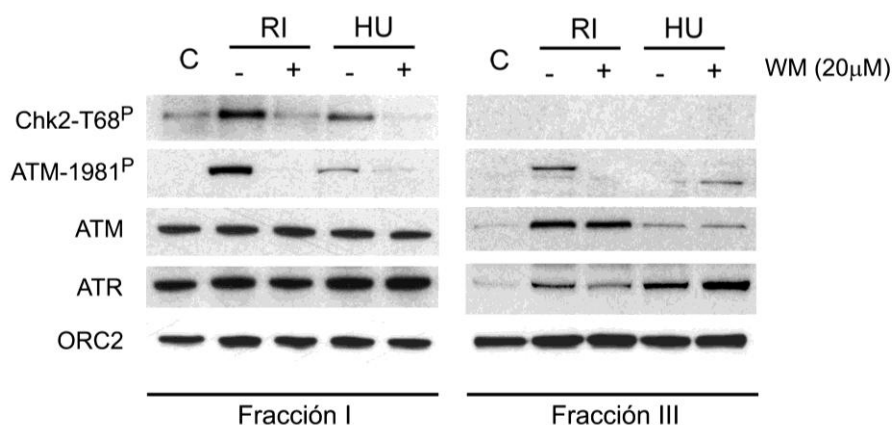
**Figura 10: Análisis de la fosforilación de Chk1 y Chk2 a lo largo del ciclo celular por citometría de flujo.** Una alícuota de las mismas células Raji que se usaron para *Western blot* y fraccionamiento de proteínas unidas a cromatina fue analizada en paralelo por citometría de flujo para la observación del contenido de ADN con yoduro de propidio y para la observación de los niveles de Chk1-S345<sup>P</sup> o Chk2-T68<sup>P</sup> con los anticuerpos específicos correspondientes. El asterisco marca la fosforilación de Chk1 en células irradiadas. Se ha dibujado una línea discontinua para ilustrar la dinámica de fosforilación. Dosis empleadas: 20 Gy RI; 2 mM HU; 20 μM WM; C, control; IP, yoduro de propidio

### 1.3 ATM regula la carga de ATR en la cromatina en respuesta a DSB

Los datos bioquímicos sugerían que la fosforilación de Chk1 por ATR en respuesta a radiación ionizante se producía después de la activación de ATM. La activación de ATM es responsable de la acumulación en las rupturas de numerosas proteínas de señalización y reparación del daño por lo que nos preguntamos si podría estar provocando una relocalización de ATR en respuesta a RI. Para esto, analizamos la unión de ATM y ATR a la cromatina tras la generación de DSB por una técnica bioquímica de fraccionamiento nuclear (figura 11) (Andegeko et al. 2001). Se aprecia cómo en respuesta a radiación ionizante, parte de la cantidad celular de ATM se redistribuye a la fracción

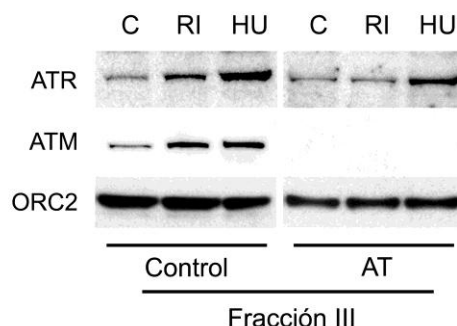
## RESULTADOS

cromatínica. Esta unión rápida de ATM a la cromatina se produjo igualmente en presencia de Wortmanina por lo que no dependía de su actividad. Por lo tanto, lo que observamos con esta técnica no es la acumulación típica en la cromatina en forma de focos, que sí dependen de ATM-1981<sup>P</sup>, sino la unión de ATM a la cromatina previa a la acumulación de factores en las rupturas. Por otra parte, constatamos que ATR también se une a la cromatina después de la exposición a HU o RI. Así pudimos afirmar que la retención que observamos con ATM de forma global en la cromatina es una propiedad de las proteínas de detección de daño más tempranas. Sorprendentemente, mientras que el reclutamiento de ATR a la cromatina en células tratadas con HU no se vio afectado por la inhibición de ATM, en el caso de células irradiadas éste desapareció completamente al tratar las células previamente con Wortmanina. Dicho de otro modo, la carga de ATR a la cromatina dañada por DSB necesitó de la actividad de ATM.



**Figura 11: Análisis de la localización de ATM y ATR tras DSBs por un protocolo de fraccionamiento nuclear.** Unión de ATM y ATR a la cromatina en células Raji tratadas o no con inhibidor de ATM. Los niveles de ATM-1989<sup>P</sup> y Chk2-T68<sup>P</sup> permiten evaluar el efecto inhibitorio de la WM. Con este método no se observó unión de Chk2 a la cromatina. En todos los casos se muestra la fracción I (citoplasmática) y la fracción III (unida a la cromatina) de los mismos extractos. Los niveles del factor de replicación Orc2 se usaron como control de carga en ambas fracciones puesto que está presente tanto en el citoplasma como en la fracción nuclear con niveles muy estables.

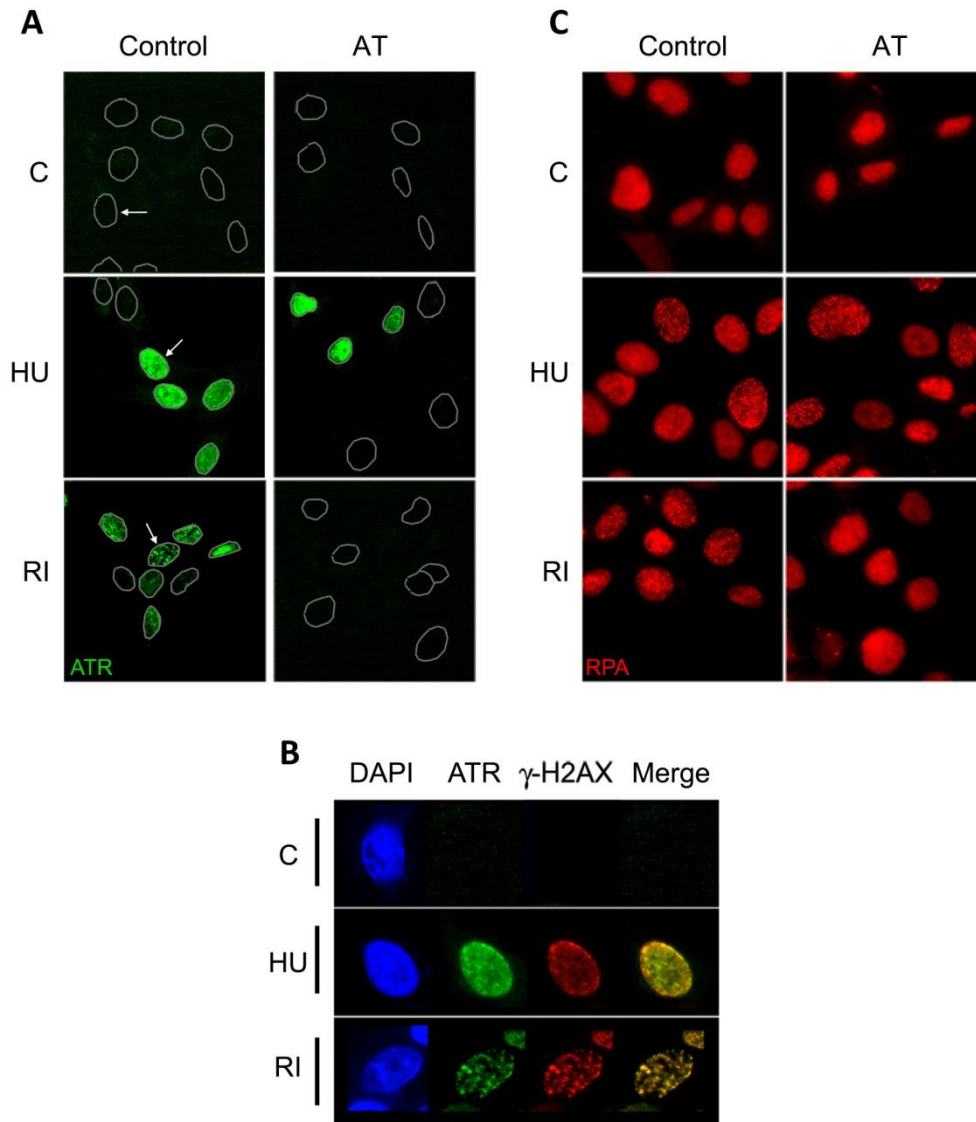
Contrastamos los resultados obtenidos con el tratamiento con Wortmanina realizando el mismo experimento en células AT. Como se puede observar en la figura 12, la carga de ATR en la cromatina en respuesta a RI no se produjo en ausencia de ATM aunque seguía produciéndose de forma independiente de ATM si el daño había sido generado con HU durante la replicación del ADN.



**Figura 12: Análisis de la fracción de proteínas unida a cromatina en líneas celulares humanas control y AT.**

Del mismo modo, utilizando un protocolo de inmunofluorescencia basado en la pre-extracción de la fracción citoplasmática con detergentes que permite evaluar la fracción de proteínas unidas a la cromatina (Mirzoeva et al. 2001), pudimos evaluar la carga de ATR a la cromatina expuesta a DSB o HU (figura 13).

De acuerdo con los datos bioquímicos, la unión de ATR a la cromatina inducida por HU se mostró independiente del estado de ATM (figura 13, A). Además, esta unión de ATR inducida por HU fue mucho mayor que la que se producía en células que habían sido irradiadas y presentó una localización pan-nuclear que contrastaba con el patrón de localización en forma de focos discretos de células irradiadas. La tinción de ATR colocalizó con la de  $\gamma$ -H2AX (figura 13, C) en ambos casos: en el caso de HU se apreció un patrón difuso por todo el núcleo de aquellas células que estaban replicando durante el tratamiento mientras que en respuesta a RI se observaron los *foci* característicos que se forman en cada DSB. Por otra parte, el análisis de RPA reveló que esta proteína se encuentra continuamente unida a la cromatina pero se relocaliza en focos discretos cuando se genera ssDNA tanto por HU como por DSB que han sido reseccionados en respuesta a RI. Hay que destacar que la ubicación de RPA mostró la misma dependencia de ATM que había mostrado ATR (figura 13, B) lo que significa que el control de ATM en el reclutamiento de ATR a la cromatina se produce en los pasos más tempranos de la ruta de señalización ATR-Chk1, posiblemente a través de promover la resección de los DSB. En resumen, los datos demuestran que ATR se recluta a la cromatina tras el daño inducido por RI de una forma dependiente de la actividad de ATM, lo que coloca a ATM por encima de ATR en la ruta de señalización ATR-Chk1 para el control de los *checkpoints* en respuesta a RI.



**Figura 13: Análisis por inmunofluorescencia de RPA y ATR en respuesta a daño en el ADN.** (A) Detección de ATR en células control y células AT expuestas a HU o RI. Ya que este protocolo solo permite ver la fracción unida a la cromatina y en condiciones normales la mayor parte de ATR se encuentra libre en el núcleo, se ha dibujado una máscara en blanco que delinea la tinción en DAPI indicando la presencia de los núcleos. (B) Imágenes de la señal de ATR y  $\gamma$ -H2AX en células individuales señaladas en (A) con una flecha. (C) Inmunofluorescencia de RPA en células control y células AT. Al igual que en los experimentos bioquímicos, se irradiaron las células con 20 Gy y se procedió a su fijación y tinción 45 minutos después o se fijaron y tiñeron tras 2 horas de tratamiento con HU 2 mM.

#### 1.4 Un nuevo modelo para las funciones de ATM/ ATR/ Chk1 en DSB

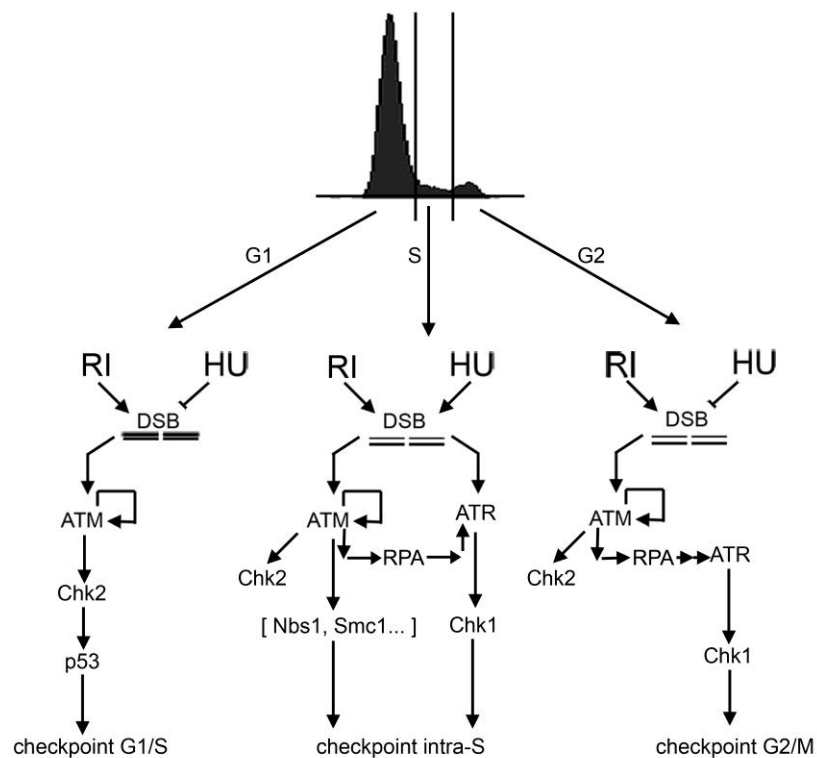
A partir de estos resultados, sugerimos un nuevo modelo (figura 14) que explicaría la señalización de los *checkpoints* inducidos por RI en las distintas fases del ciclo celular.

a) En respuesta a RI, ATM fosforila a Chk2. Conjuntamente, ambas quinasas estimulan la actividad de p53 lo que regula el *checkpoint* G1/S a través de p21.



b) En fase S, ambas quinasas ATM y ATR, controlan los *checkpoints* a través de dos vías independientes. Por un lado, en respuesta a agentes que promueven ER como HU o afidicolina, se desencadena una cascada de señalización a través de ATR y Chk1 que no depende de ATM. Cabe mencionar que en los experimentos se detectó un mayor reclutamiento de ATR a la cromatina en respuesta a HU en ausencia de ATM, lo que podría sugerir que una mayor señalización por ATR compensa la falta de ATM. A nivel de efectores, la señalización de los *checkpoints* en respuesta a RI en fase S está mediada por proteínas como Nbs1 y Smc1 que regulan la dinámica de replicación independiente de Chk2.

c) Además, en respuesta a DSB generados en S y G2, ATM coordina la fosforilación de Chk1 a través de la carga de ATR a la cromatina dañada, lo que explica la necesidad de ambas quinasas en la regulación de los *checkpoints* en respuesta a RI.



**Figura 14: Interacciones entre ATM, ATR, Chk2 y Chk1 en la respuesta a daño en el ADN.** El diagrama ilustra los determinantes moleculares que controlan las respuestas a RI y a HU que se inician en las distintas fases del ciclo. Mientras que la célula restringe las actividades de ATR y Chk1 a la fase S del ciclo celular, la actividad de ATM es necesaria a lo largo de todo el ciclo.

## RESULTADOS

Este trabajo demuestra que existe una comunicación activa entre las vías de señalización de ATM y ATR que contribuye en la cascada molecular que controla los *checkpoints* en células postreplicativas. ATM regula la activación de ATR en respuesta a RI a nivel de su reclutamiento a la cromatina. Hemos visto que la unión de RPA a las rupturas está disminuida en células irradiadas cuando inhibimos la actividad de ATM. La unión de ATR a la cromatina dañada requiere el procesamiento de los DSB a ssDNA, que son las estructuras reconocidas por RPA. Los resultados de este trabajo sugerían un papel importante de la cromatina en el establecimiento de la DDR. Así, esto nos llevó a explorar cómo diferentes configuraciones de la cromatina podrían afectar a la señalización y reparación del daño en el ADN

## 2. La compactación global de la cromatina limita la magnitud de la respuesta al daño en el ADN

Numerosos factores de la DDR acuden a los DSB atraídos por cambios estructurales que se producen en el lugar de la lesión. Una de las alteraciones más tempranas en la lesión y la más conocida es la fosforilación de H2AX (Rogakou et al. 1998) pero también son importantes las modificaciones producidas por complejos remodeladores en la cromatina tras la generación de daño y otras modificaciones de histonas que se producen *de novo* o quedan expuestas tras una ruptura. A un nivel más amplio se ha observado que la generación de DSB conduce a una relajación global de la cromatina (Takahashi et al. 1985; Ziv et al. 2006) por lo que se ha propuesto que una configuración de la cromatina más abierta permitiría el acceso más rápido de los factores de reparación a los DSB. Sin embargo se desconocía el impacto real que tiene en la DDR el estado de compactación de la cromatina. Bajo dos enfoques diferentes (empleando células madre murinas con niveles reducidos de histona H1 y usando inhibidores de histonas desacetilasas) investigamos la capacidad de las células para establecer la DDR en un contexto de cromatina “abierta” o más accesible.

### 2.1 La deficiencia en H1 en células de mamíferos promueve una estructura abierta de la cromatina

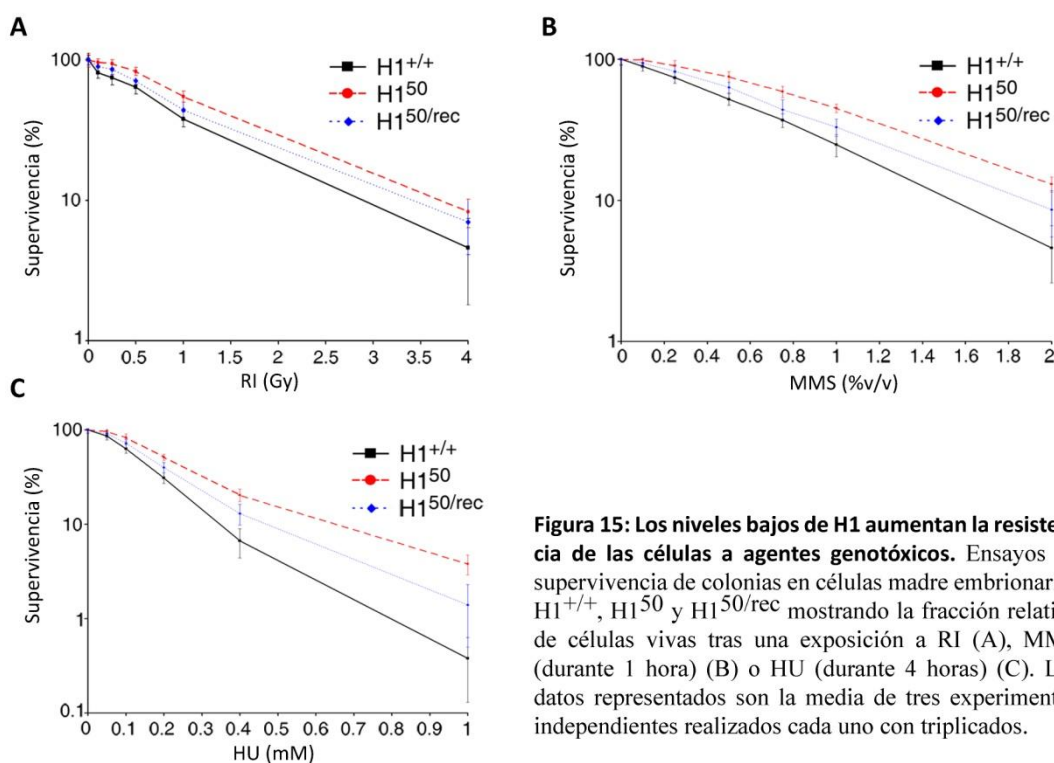
Como modelo de cromatina abierta decidimos emplear una línea de células madre embrionarias de ratón con una reducción del 50% de los niveles totales de la histona H1 (Fan et al. 2005). Esta línea (H1<sup>50</sup>) fue generada en el laboratorio de Arthur I. Skoultschi al deleccionar 3 de los 6 genes que codifican para las diferentes isoformas somáticas de H1. La razón para utilizar esta línea fue que estudios previos habían demostrado que, en efecto, la cromatina era globalmente más accesible en estas células, y además presentaba muy pocos cambios en su transcriptoma. En paralelo, empleamos para todos los experimentos la línea embrionaria control con el 100% de los niveles de H1 (H1<sup>+/+</sup>).

### 2.2 Las células H1<sup>50</sup> muestran una mayor resistencia a genotoxicidad

Para evaluar cómo las células deplecionadas en H1 respondían a los DSB analizamos la supervivencia de células mutantes y de células control mediante un ensayo de formación de colonias después de una breve exposición a agentes genotóxicos (figura 15). La cuantificación de

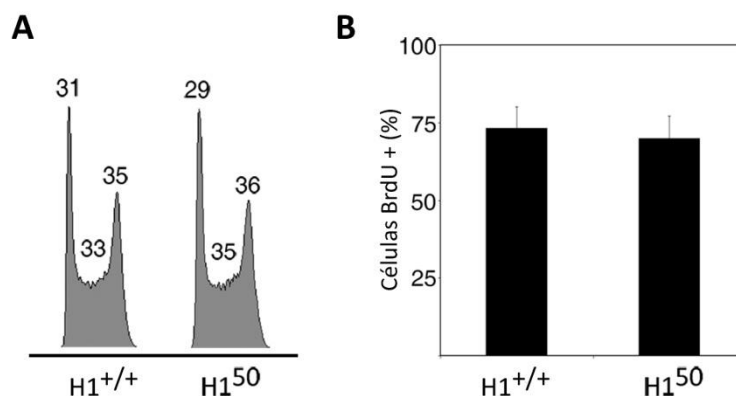
## RESULTADOS

colonias de supervivencia tras el tratamiento con radiación ionizante, metil metano sulfonato (MMS) o hidroximetil urea (HU) reveló que las células  $H1^{50}$  son más resistentes a agentes genotóxicos que las células  $H1^{+/+}$ . Para reconstituir parcialmente los niveles de H1, generamos una línea de células embrionarias de ratón mediante transfección de un plásmido que contenía H1d exógena en  $H1^{50}$ . Tras la selección con antibiótico, las células fueron analizadas por HPLC y se comprobó que presentaban niveles de H1 intermedios a  $H1^{+/+}$  y  $H1^{50}$  (datos no mostrados). En todos los casos, la reconstitución parcial de las células mutantes con H1 exógena (células que llamamos  $H1^{50/rec}$ ) condujo a un fenotipo intermedio en el índice de supervivencia. Las células mutantes mostraron una mayor supervivencia en todos los casos, siendo ésta más acusada tras el tratamiento con HU y MMS (figura 15, B y C) que con RI (figura 15 A). Este comportamiento ya inicialmente sugería que la mayor relajación de la cromatina afecta en mayor medida a la ruta molecular de ATR que a la señalización por ATM.



**Figura 15: Los niveles bajos de H1 aumentan la resistencia de las células a agentes genotóxicos.** Ensayos de supervivencia de colonias en células madre embrionarias  $H1^{+/+}$ ,  $H1^{50}$  y  $H1^{50/rec}$  mostrando la fracción relativa de células vivas tras una exposición a RI (A), MMS (durante 1 hora) (B) o HU (durante 4 horas) (C). Los datos representados son la media de tres experimentos independientes realizados cada uno con triplicados.

Como control, y puesto que la HU solo activa la DDR en células en replicación, comprobamos que este comportamiento no se debía a diferencias en la proliferación. Así, el análisis por citometría de flujo reveló que ambos genotipos tienen un perfil de ciclo celular y una tasa de replicación similares (figura 16).

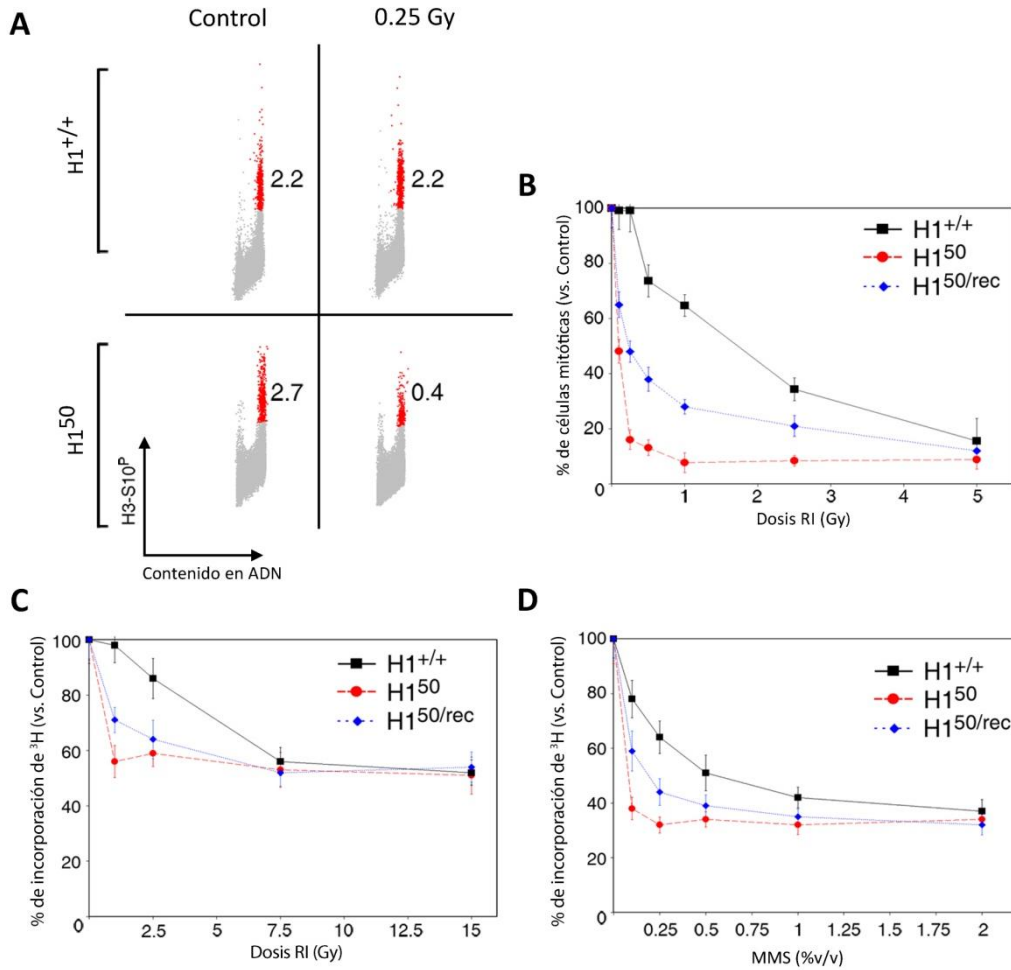


**Figura 16: No se observaron diferencias en la proliferación de ambas líneas.** (A) Perfil de ciclo celular de células H1<sup>+/+</sup> y H1<sup>50</sup>. Los números indican el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo (G1, S y G2). (B) Porcentaje de células positivas para BrdU en ambos genotipos tras 4 horas de exposición a BrdU. Las barras de error representan la desviación estándar.

### 2.3 Las células H1<sup>50</sup> muestran *checkpoints* hipersensibles

La mayor supervivencia podría reflejar una DDR más eficiente en las células deficientes en H1. Esta respuesta celular puede medirse a través de la capacidad de las células para activar los *checkpoints*, una de las consecuencias de la DDR. Así, estudiamos la activación del *checkpoint* G2/M, que depende tanto de ATM como de ATR, y del *checkpoint* intra-S tras inducir daño en las diferentes líneas celulares (figura 17). Si bien el efecto principal se observaba con HU, decidimos utilizar RI para el resto de los experimentos, ya que pensamos que el daño generado por RI en principio no iba a verse afectado por la configuración de la cromatina, algo que quizás sí podría pasar en el caso de agentes químicos. En cualquier caso, y como hemos comentado en el apartado anterior, la respuesta a irradiación depende de manera coordinada de tanto ATM como ATR.

En general, las células H1<sup>50</sup> y H1<sup>+/+</sup> se pararon de forma similar ante dosis altas de RI, pero observamos diferencias en la activación de los *checkpoints* con dosis bajas de daño: las células mutantes activaron ambos *checkpoints* cuando fueron tratadas con dosis de radiación ionizante o MMS que no fueron suficientes para inducir una respuesta de parada de ciclo en las células control (figura 17, B, C y D). Además, activaron de forma más robusta el *checkpoint* G2/M ante todas las dosis de radiación ionizante que empleamos (figura 17, B), hecho que se aprecia por el menor número de células en mitosis que presentaron las células deficientes en H1 comparadas con las células control ante la misma dosis de RI (figura 17, A). De nuevo, este efecto se vio paliado mediante la reconstitución parcial de los niveles de H1. En resumen, niveles reducidos de la histona H1 resultan en una respuesta a daño en el ADN aumentada que se observa como una mejor activación de los *checkpoints*.



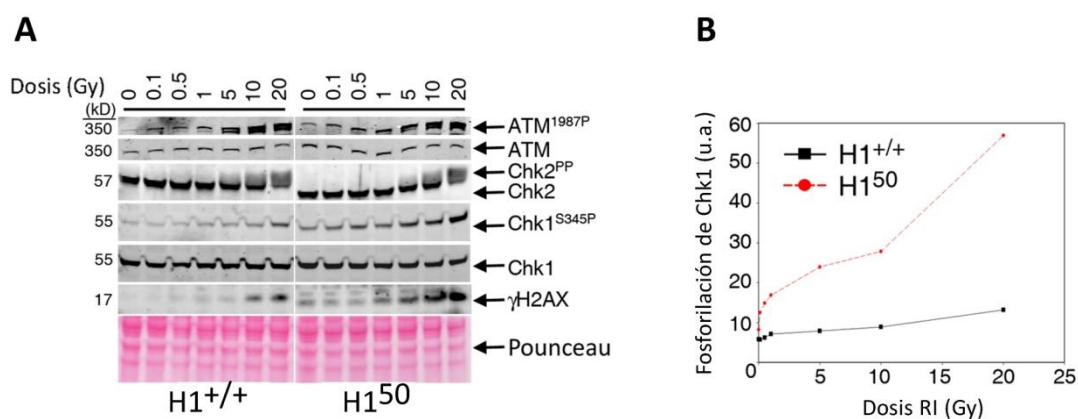
**Figura 17: Las células con niveles reducidos de H1 presentan checkpoints hipersensibles.** (A) Distribución del ciclo celular de células  $H1^{+/+}$  y  $H1^{50}$  antes (control) y 45 minutos después de tratamiento con 0.25 Gy. La tinción con yoduro de propidio (eje x) y con anticuerpo frente a la fosforilación de H3S10 permite distinguir las células mitóticas (en rojo) de las células en G2. En todos los casos se indica el porcentaje de células mitóticas. (B) Porcentaje de células mitóticas (normalizado frente a células no tratadas) en  $H1^{+/+}$ ,  $H1^{50}$  y  $H1^{50}/rec$  tras su exposición a diferentes dosis de radiación ionizante tal y como se describe en A. (C y D) Activación del checkpoint intra-S en células  $H1^{+/+}$ ,  $H1^{50}$  y  $H1^{50}/rec$  expuestas a dosis crecientes de RI (C) y MMS (D).

## 2.4 Las células $H1^{50}$ activan una mayor DDR

Nos propusimos aclarar las causas por las que una configuración de la cromatina más abierta conduce a una DDR más eficaz en las células  $H1^{50}$  y con este objetivo estudiamos la cascada de señalización implicada en la inducción de la parada. El estudio bioquímico (figura 18, A) mostró que las células mutantes presentaban mayores niveles de fosforilación de  $\gamma$ -H2AX que las células control ante la misma dosis de RI (resultado que se repetía con el tratamiento con MMS y HU).

Consistente con los resultados observados en la activación de los *checkpoints* G2/M e intra-S, las células mutantes también mostraron mayores niveles de Chk1-S345<sup>P</sup>, quinasa efectora de *checkpoints* cuya actividad está restringida a estas fases del ciclo (Zhao et al. 2002) (figura 18, B).

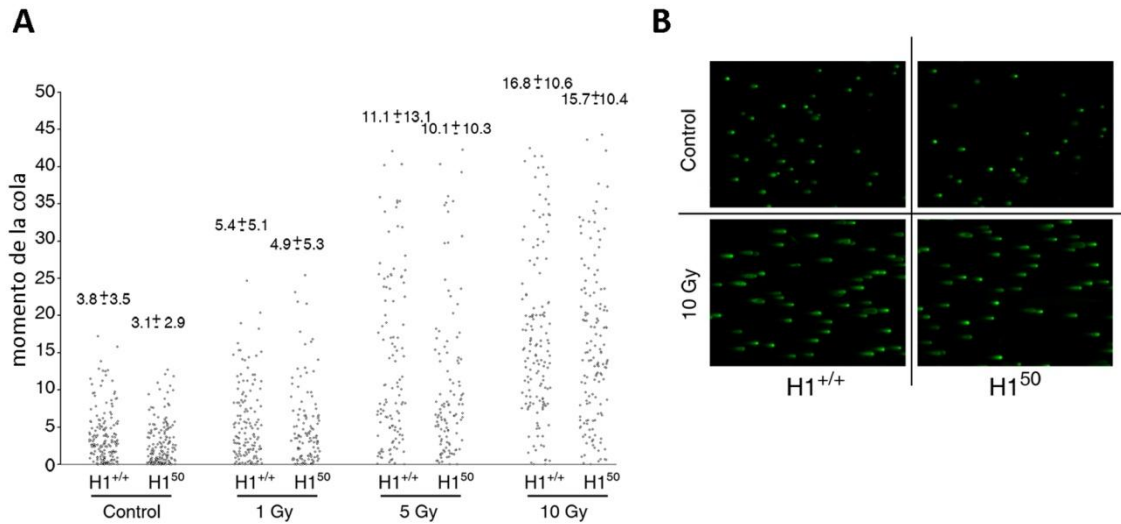
Más aún, los datos bioquímicos fueron coherentes con las curvas de supervivencia (figura 15), ya que en efecto se observó una mayor activación de la ruta de ATR (medida por la fosforilación de Chk1), pero no de ATM (medida por la fosforilación de ATM y Chk2). Estos resultados demuestran que la elevada DDR que se produce en ausencia de H1 se debe a una mayor activación de la ruta de ATR.



**Figura 18: Análisis bioquímico de la DDR en células H1<sup>+/+</sup> y H1<sup>50</sup>.** (A) Fosforilación de ATM, Chk2, Chk1, y H2AX analizadas por *Western blot* en H1<sup>+/+</sup> y H1<sup>50</sup> tratadas con dosis crecientes de radiación ionizante. (B) Cuantificación de la fosforilación de Chk1 observada en (A).

El aumento en los niveles de fosforilación de H2AX y Chk1 en las células H1<sup>50</sup> podía deberse a (1) que se estuviesen generando más rupturas ante la misma dosis de daño, o (2) que cada DSB generado señalizase con más intensidad. Para evaluar la cantidad de daño generada, empleamos una técnica que detecta la aparición de rupturas en el ADN: el ensayo de cometa (figura 19). Este método permite visualizar el nivel de fragmentación del ADN tanto en DSB como en ssDNA de células individuales, lo que se puede cuantificar midiendo la proporción de ADN en el cometa. Determinamos el nivel de fragmentación del ADN de células H1<sup>50</sup> y H1<sup>+/+</sup> tratadas con varias dosis de radiación ionizante y se comprobó que no existían diferencias entre las dos líneas en cuanto a cantidad de rupturas generadas (figura 19, A).

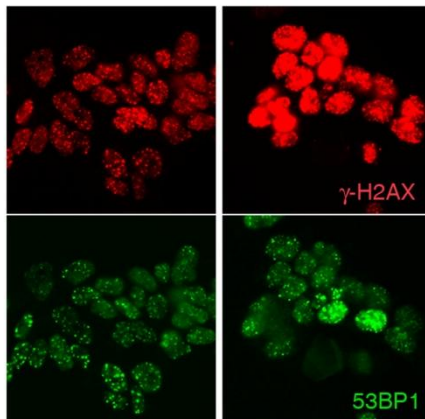




**Figura 19: Las células H1<sup>+/+</sup> y H1<sup>50</sup> presentan la misma cantidad de DSB tras la exposición a daño en el ADN. Ensayo de cometa.** Cuando existen rupturas, el ADN escapa del núcleo si se establece una corriente eléctrica y puede ser visualizado mediante tinción con Sybr-green. Un software de análisis permite cuantificar la cantidad de ADN escapado (cola del cometa) como momento de la cola del cometa, una medida del número de DSB. (A) Cantidad de DSB cuantificada como el momento de la cola del cometa en células H1<sup>+/+</sup> y H1<sup>50</sup> expuestas a dosis crecientes de RI. Los números indican la mediana de los valores y la desviación estándar. El experimento se repitió tres veces con resultados equivalentes. (B) Imagen representativa del cometa en células H1<sup>+/+</sup> y H1<sup>50</sup> control e irradiadas.

## 2.5 Una cromatina abierta posibilita una mayor señalización de cada DSB

Los resultados anteriores descartaban que la DDR exacerbada que se observaba en células H1<sup>50</sup> se debiera a la generación de más rupturas. Por lo tanto, otra hipótesis que podía explicar la mayor activación de la DDR era que hubiese más señalización del daño por cada DSB. Decidimos entonces evaluar la activación de la DDR en cada DSB analizando la distribución de focos de 53BP1 y de  $\gamma$ -H2AX en respuesta a radiación ionizante (figura 20).

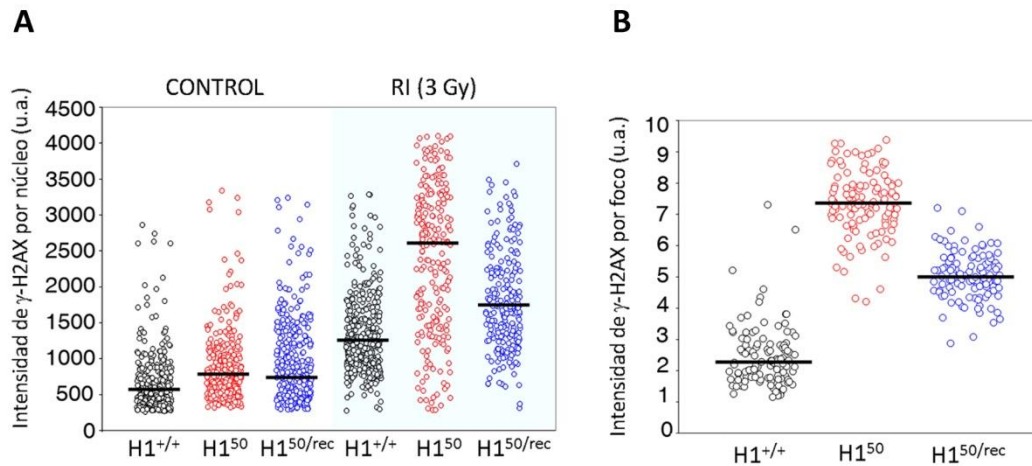


**Figura 20: Los niveles de  $\gamma$ -H2AX por núcleo son mayores en las células deplecionadas en H1.** Imagen de los focos de  $\gamma$ -H2AX (rojo) y 53BP1 (verde) analizados en células H1<sup>+/+</sup> y H1<sup>50</sup> 45 minutos después de irradiar con 3 Gy por microscopía de alto rendimiento.



Tratamos ambas líneas celulares con 3 Gy de radiación ionizante y 45 minutos después fijamos las células y realizamos una inmunofluorescencia de alto rendimiento. Las imágenes tomadas mostraron la presencia de una mayor fosforilación de  $\gamma$ -H2AX por cada DSB (identificado por la señal de 53BP1) en las células  $H1^{50}$  en comparación con las células  $H1^{+/+}$ .

Así, y consistente con los datos bioquímicos, el análisis de las imágenes por microscopía de alto rendimiento mostró que la media de intensidad de  $\gamma$ -H2AX por núcleo era significativamente mayor en las células deplecionadas en H1 (figura 21, A). Lo más interesante fue descubrir que la cantidad de  $\gamma$ -H2AX en cada foco era mayor en las células  $H1^{50}$  que en las  $H1^{+/+}$  (figura 21, B). En ambos análisis se observó en las células reconstituidas ( $H1^{50/rec}$ ) un fenotipo intermedio al de las células  $H1^{+/+}$  y las  $H1^{50}$ . Por lo tanto, la DDR hiperactiva que presentan las células  $H1^{50}$  es debida a una mayor señalización en cada DSB.

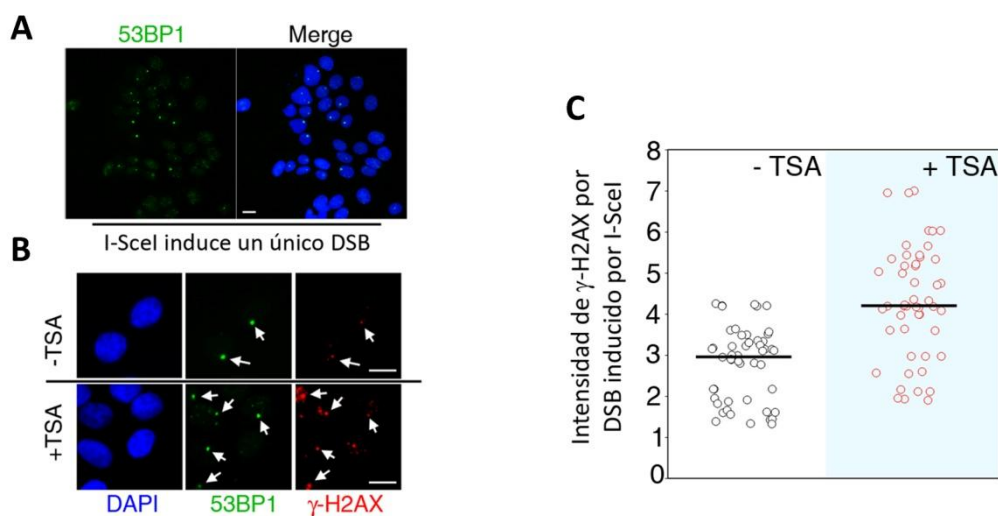


**Figura 21: Las células  $H1^{50}$  tienen más  $\gamma$ -H2AX por DSB.** (A) Distribución de la intensidad de  $\gamma$ -H2AX por núcleo obtenida por microscopía de alto rendimiento de poblaciones control e irradiada de los diferentes genotipos. Las barras color negro marcan la mediana de los valores obtenidos. (B) Cuantificación de la cantidad de  $\gamma$ -H2AX (intensidad) presente en cada foco.

Finalmente, quisimos comprobar que la mayor eficacia en la DDR que se observó en  $H1^{50}$  era una consecuencia de la apertura de la cromatina y no relacionada con alguna propiedad de H1 en particular. Para ello, se evaluó la dinámica de señalización de un DSB en células humanas MCF7 tratadas con un inhibidor de histonas desacetilasas, la tricostatina A (TSA). El tratamiento con TSA impide que se pierdan los grupos acetilo de las histonas lo que favorece un estado conformacional más abierto de la cromatina (eucromatínico). A nivel global, se observaron resultados idénticos a los obtenidos con las células deficientes en H1 en lo referente a una mayor actividad de la ruta de ATR (datos no mostrados). Sin embargo, esta aproximación nos permitió hacer un experimento crítico y capaz de demostrar formalmente que la señalización por cada DSB se ve incrementada en

## RESULTADOS

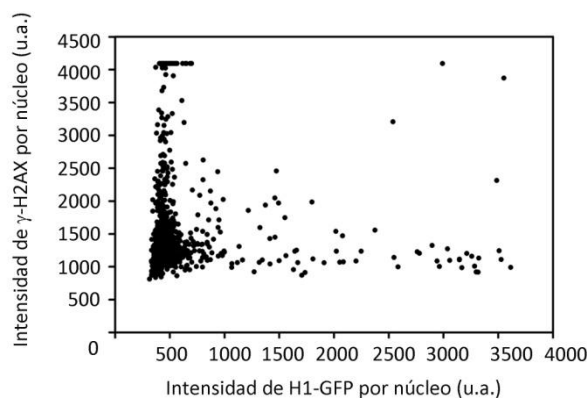
un entorno de cromatina relajada. Para ello, se utilizó una línea de cáncer de mama (MCF7) que presenta un único sitio de reconocimiento de la nucleasa *I-SceI*, lo que permite generar un único DSB de manera controlada mediante la transducción con virus productores de *I-SceI* (figura 22). Bajo el tratamiento con TSA, la señalización de cada ruptura, medida como intensidad de  $\gamma$ -H2AX, se vio aumentada en comparación con células no tratadas (figura 22, B y C). Así, y al igual que ocurre con células con bajos niveles de H1, células tratadas con TSA presentan una mayor señalización de cada ruptura, demostrando que la condensación de la cromatina limita la intensidad de la señalización de cada DSB.



**Figura 22: El pretratamiento con TSA estimula la DDR.** (A) Imagen representativa del patrón del único DSB inducido por *I-SceI* medido como foco de 53BP1 en células MCF7<sup>*I-SceI*</sup> transducidas con la nucleasa. La barra de escala representa 20 μm. (B) Imagen representativa de los focos de 53BP1 y  $\gamma$ -H2AX inducidos por *I-SceI* (flechas blancas) en células MCF7<sup>*I-SceI*</sup> transducidas con la nucleasa, tratadas y no tratadas con TSA. Se añadió TSA (0,1 mM, 5 horas) 24 horas después de la transducción viral. La barra de escala representa 20 μm. (C) Cuantificación de la cantidad de  $\gamma$ -H2AX (intensidad) en cada foco inducido por *I-SceI* en células control y células pre-tratadas con TSA.

En resumen, los datos obtenidos por la depleción de H1 y por el tratamiento con TSA demuestran que la magnitud de la DDR desencadenada en cada DSB está modulada por la configuración de la cromatina.

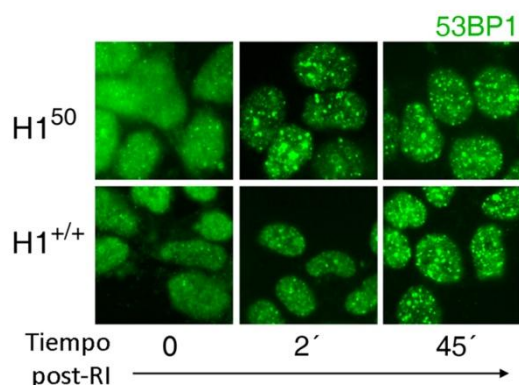
Finalmente, y con objeto de unificar ambos modelos utilizados, estudiamos la intensidad de activación de la DDR en células MCF7 en las que mediante una transfección transitoria sobreexpresamos H1 (figura 23). De forma notable, las células con mayores niveles de H1 mostraron una respuesta limitada ante las rupturas en el ADN como puede observarse por los menores niveles de fosforilación de H2AX que presentaron. Estos resultados sugieren que, en principio, cambios en los niveles de H1 pueden ser capaces de modular la intensidad de la DDR.



**Figura 23: La sobreexpresión de H1 limita la respuesta a daño en el ADN.** Células MCF7 transfectadas con un constructo que expresa H1-GFP fueron irradiadas con 3 Gy y procesadas para microscopía de alto rendimiento 20 minutos después. La imagen muestra la distribución de las intensidades de  $\gamma$ -H2AX y GFP para cada uno de los núcleos individuales detectados.

## 2.6 Niveles bajos de H1 facilitan el acceso de las proteínas de la DDR a las rupturas

En diversos trabajos se ha propuesto que la cromatina se relaja tras la generación de un DSB para favorecer el reclutamiento de las proteínas de la DDR a la ruptura del ADN (Hittelman et al. 1984; Ljungman 1989; Ziv et al. 2006; Rubbi et al. 2003). Sin embargo, esto no había sido demostrado, y era posible que cambios en la accesibilidad no tuviesen un efecto apreciable en la reparación o señalización del daño. Para evaluar si el acceso de las proteínas a las rupturas estaba facilitado en las células deficientes en H1, realizamos un análisis cinético del reclutamiento de 53BP1 en focos discretos después de generar daño con radiación ionizante. En las células  $H1^{50}$ , 53BP1 se relocalizó en forma de focos significativamente más rápido que en células control (figura 24).



**Figura 24: 53BP1 acude antes a los DSB en células  $H1^{50}$ .** Cinética de la formación de focos de 53BP1 en células  $H1^{+/+}$  y  $H1^{50}$  tras una exposición a 3 Gy. Mientras que solo se detectan algunos focos 2 minutos después de RI en la línea control, en la línea mutante ya son claramente detectables muchos focos de 53BP1.

Para poder hacer un seguimiento longitudinal de este ensayo también analizamos la cinética de relocalización de 53BP1 a los DSB generados mediante microirradiación con un láser UV, con la ayuda de un microscopio confocal. Para ello, transfectamos 53BP1 fusionado a GFP en células  $H1^{+/+}$  y  $H1^{50}$  y seleccionamos para el experimento poblaciones de ambos genotipos con niveles similares de proteína transfectada. De nuevo, se observó un mayor reclutamiento de 53BP1-GFP a las zonas dañadas en células  $H1^{50}$  en comparación con células  $H1^{+/+}$  (datos no mostrados). Este

resultado demuestra que, en efecto, la relajación de la cromatina facilita el acceso de los factores de la DDR a las rupturas, que se produce más rápido y en mayor medida tras la generación de un DSB.

### 2.7 Niveles bajos de H1 estimulan de la reparación por HR

A pesar de que las células H1<sup>50</sup> presentaron una mayor señalización por cada ruptura y una mayor activación de los *checkpoints*, la disminución de los niveles de H1 solo condujo a un impacto moderado en la resistencia a los DSB generados tras una única exposición a agentes genotóxicos. Bajo condiciones de un daño sistemático, como el que se produce durante la replicación, la presencia constante de una DDR hiperactiva podría tener mayor repercusión en células H1<sup>50</sup> a largo plazo. En concreto, dado que el efecto en la DDR era por una mayor actividad de ATR y esta quinasa promueve la reparación por HR, decidimos analizar las consecuencias de los bajos niveles de H1 en la HR que se produce de manera natural. Para ello, se evaluaron los niveles endógenos de HR que se produce en los telómeros por el intercambio de material genético entre las cromátides hermanas (*telomeric sister chromatid exchange* o T-SCE). Este fenómeno se da de manera constante y es una de las formas por la que se regula la longitud telomérica independiente de telomerasa. Estos experimentos que fueron realizados por el laboratorio de la Dra. María Blasco y que no se muestran en esta Tesis, revelaron que las células H1<sup>50</sup> presentaban una tasa de recombinación telomérica significativamente más alta que las células control, lo que conducía a un alargamiento de los telómeros en la línea mutante. Estos resultados son acordes con otras observaciones previas del grupo de María Blasco en las que se había observado que la heterocromatina telomérica limita el alargamiento de los telómeros (Blasco 2007).

### 2.8 La bajada de H1 no afecta de forma importante a la transcripción génica

Se había demostrado que, con la excepción de un pequeño grupo de genes, el perfil de expresión génica de las células silvestres y las células deplecionadas en H1 era prácticamente idéntico, lo que sugería que las diferencias observadas en la señalización de los DSB eran probablemente debidas al papel de H1 en la estructura de la cromatina (Fan et al. 2005). Sin embargo, y debido a que el estudio previo no ofrecía una visión del transcriptoma, realizamos un análisis global del transcriptoma por *microarrays* de cobertura completa (Agilent 44K) (tabla 1) que además de confirmar los estudios previos, permitió confirmar que efectivamente, no existían diferencias significativas en la transcripción de los componentes de la DDR (tabla 2).



Genes con la expresión alterada en células H1 <sup>50</sup>		
Incremento de expresión		
Gen	KO vs Wt	Nombre común
Genes con la expresión aumentada en células H1 <sup>50</sup> *		
Eif2s3y	7,35	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene Y-linked
Rian	6,20	RNA imprinted and accumulated in nucleus
Acta2	5,85	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
Gtl2	5,70	GTL2, imprinted maternally expressed untranslated mRNA
Mirg	5,55	miRNA containing gene
Trim67	4,91	tripartite motif-containing 67
Gtl2	4,67	GTL2, imprinted maternally expressed untranslated mRNA
Usp26	4,55	ubiquitin specific peptidase 26
Acta1	4,51	actin, alpha 1, skeletal muscle
Ddx3y	4,49	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked
LOC435271	4,42	similar to schlafen 3
Ube1y1	4,39	ubiquitin-activating enzyme E1, Chr Y 1
H19	4,33	H19 fetal liver mRNA
Inhba	4,25	inhibin beta-A
Thbs1	4,18	thrombospondin 1
Gtl2	4,05	GTL2, imprinted maternally expressed untranslated mRNA
Serpine1	4,04	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1
Tagln	4,02	transgelin
Gtl2	3,94	GTL2, imprinted maternally expressed untranslated mRNA
Slc15a2	3,93	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2
Xlr5d	3,88	X-linked lymphocyte-regulated 5D
Tex13	3,85	testis expressed gene 13
1110055J05Rik	3,79	RIKEN cDNA 1110055J05 gene
Prss23	3,77	protease, serine, 23
Cyp1a1	3,72	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1
Genes con expresión disminuida en células H1 <sup>50</sup>		
Erg	0,16	avian erythroblastosis virus E-26 (v-ets) oncogene related
Plce1	0,16	phospholipase C, epsilon 1
E2f8	0,16	E2F transcription factor 8
Pdyn	0,15	prodynorphin
Slc23a1	0,15	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 1
Nkx6-3	0,15	NK6 transcription factor related, locus 3 (Drosophila)
Plce1	0,14	phospholipase C, epsilon 1
Dpp4	0,14	dipeptidylpeptidase 4
Vit	0,14	vitrin
Dpp4	0,13	dipeptidylpeptidase 4
Mid1	0,13	midline 1
Fut2	0,13	fucosyltransferase 2
Sfrp4	0,12	secreted frizzled-related sequence protein 4
Inhbb	0,12	inhibin beta-B
Crhbp	0,12	corticotropin releasing hormone binding protein
Dcdc2a	0,11	doublecortin domain containing 2a
Gm1967	0,10	gene model 1967, (NCBI)
Slc6a1	0,09	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 1
Cd96	0,09	CD96 antigen
Chac1	0,07	ChaC, cation transport regulator-like 1 (E. coli)
LOC629147	0,05	similar to Cortixin-1
Hist1h1d	0,02	histone 1, H1d
Hist1h1e	0,01	histone 1, H1e

\* La expresión de los genes en rojo está regulada por imprinting

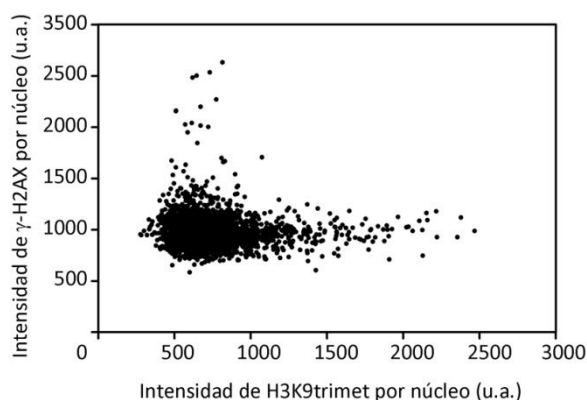
**Tabla 1: El perfil transcripcional de las células H1+/+ y H150 difiere solo en un pequeño número de genes.** Lista de los 20 genes que presentan mayores diferencias en transcripción. Una fracción importante de los genes sobrexpresados están afectados por imprinting, lo que es consistente con un estudio previo (Fan et al. 2005). Destacamos que los genes H1d y H1e presentan la mayor disminución en transcripción, lo que resulta una medida de la potencia del ensayo.

Expresión de proteínas de la DDR		
Gen	Incremento de expresión	
	KO vs Wt	Nombre común
ATM	0,63	Ataxia Telangiectasia Mutated homolog
ATR	0,98	ATM and Rad3-related (ATR)
H2AX	0,96	H2A histone family, member X
CHK1	0,67	Checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe)
RAD17	1,07	Rad17 homolog (S. pombe)
RAD51	1,04	Rad51 homolog (S. cerevisiae)
CLSPN	0,89	Claspin homolog (X. laevis)
TOPBP1	1,26	Topoisomerase (DNA) II beta binding protein
53BP1	0,78	Transformation related protein 53 binding protein 1
SMC1	0,90	Structural maintenance of chromosomes 1A

**Tabla 2: La expresión de los genes de la DDR no se ve significativamente afectada por los bajos niveles de H1.** Nivel de transcripción de los genes de la DDR relevantes para nuestro estudio. Ninguno de los genes fue seleccionado como significativamente modificado en el análisis estadístico.

## 2.9 ¿Puede la compactación de la cromatina explicar la variabilidad de la DDR en una población celular?

En esta Tesis hemos demostrado que podemos cuantificar la fosforilación de  $\gamma$ -H2AX por microscopía de alto rendimiento en células individuales. Cuando se analiza la intensidad de la señal de  $\gamma$ -H2AX en una población de células irradiadas, se pone de manifiesto que dentro de una misma población celular existe variabilidad en la intensidad a la que cada célula activa la DDR. Si bien esto puede deberse a muchas otras razones, como la propia variación en los niveles de proteínas de la DDR, nos preguntamos si estas diferencias podían también estar influenciadas por diferencias en el estado de compactación de su cromatina. De hecho, en la figura 25 se muestra cómo las células MCF7 de una misma población celular fosforilan H2AX en diferente medida de forma inversamente proporcional a sus niveles de la marca epigenética H3K9 trimetilada (marca característica de heterocromatina).



**Figura 25: Variabilidad intercelular en la DDR de acuerdo con el grado de heterocromatinización.** Análisis por microscopía de alto rendimiento de células MCF7 irradiadas con 3 Gy y procesadas 20 minutos después. La imagen muestra la distribución de las intensidades de  $\gamma$ -H2AX y H3K9 trimetilada en cada uno de los núcleos detectados.

Esta tendencia sugiere que la heterocromatina, de magnitud variable de una célula a otra y dentro del mismo núcleo, limita la señalización de las rupturas en el ADN. Esto tendría implicaciones en la reparación de rupturas en determinadas zonas del cromosoma. De hecho, trabajos posteriores han demostrado que la reparación de los DSB que se producen en regiones ricas en H3K9 trimetilada es alrededor de dos veces más lenta que la reparación en regiones eucromáticas (Goodarzi et al. 2008). Además, otros estudios han observado que en regiones altamente heterocromáticas y ricas en H3K9 trimetilada la fosforilación de  $\gamma$ -H2AX está gravemente impedida (Kim et al. 2007; Ayoub et al. 2008). Teniendo en cuenta que detectamos diferencias en los niveles de trimetilación de H3K9 de hasta tres veces entre las células de una población clonal, pensamos que estas diferencias de una célula a otra serán más pronunciadas *in vivo* de lo que lo son en cultivo. La correlación entre la estructura de la cromatina y la respuesta a daño en el ADN podría ayudar a explicar la heterogeneidad en la intensidad de la DDR que se observa en las diferentes células de un organismo.

En conjunto, estos resultados demuestran que la compactación de la cromatina limita la magnitud de la respuesta a daño en el ADN. Asimismo, empleando dos sistemas diferentes, se pone de manifiesto que la relajación de la cromatina provoca una mayor señalización en cada DSB, y lo hace afectando en mayor medida a la ruta de ATR que a la de ATM. A nivel celular, la apertura de la cromatina confiere a las células una mayor resistencia a los DSB y estimula la reparación por recombinación homóloga, provocando el alargamiento de los telómeros. Ambas propiedades, mejor reparación y telómeros más largos, en principio sugieren efectos beneficiosos para estas células. Habiendo demostrado los principios de nuestras observaciones *in vitro*, quisimos estudiar la relevancia de la relación entre la compactación de la cromatina y la eficiencia de la DDR *in vivo* y evaluar el alcance de esta “super-respuesta” en la fisiología de un mamífero. Desgraciadamente, el sistema utilizado hasta el momento no permitía la realización de un modelo animal ya que tal

## RESULTADOS

reducción de los niveles de H1 había mostrado ser letal a nivel embrionario (Fan et al. 2003). Por ello, y por las razones que se exponen a continuación, decidimos generar un modelo animal murino *knock-out* condicional para una proteína que había mostrado recientemente tener funciones compactadoras de la cromatina *in vitro*: L3MBTL1 (Trojer et al. 2007).



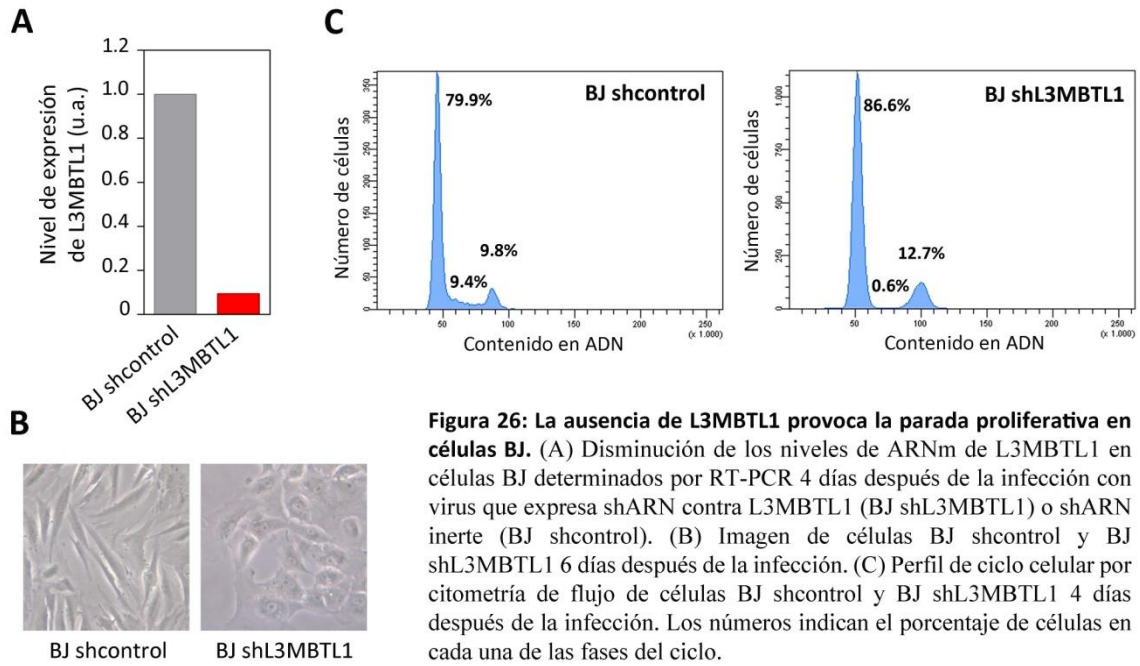
### 3- Desarrollo de un modelo animal de cromatina abierta

En base a los resultados anteriores, decidimos explorar cómo alteraciones en la cromatina abierta podrían afectar a la fisiología del organismo. Para ello, decidimos centrarnos en la proteína L3MBTL1. Esta proteína había sido identificada como una compactadora de la cromatina al tiempo que publicábamos nuestro trabajo en H1 (Murga et al. 2007), su unión a H1 modificada podía sugerir una extensión natural a nuestro trabajo. Además, en cualquier caso e independientemente de su efecto en la DDR, había varias razones que sugerían que un modelo animal de L3MBTL1 podría tener mucha relevancia para procesos relacionados con el cáncer. Así, esta proteína es un supresor de tumores en *Drosophila*, regula la expresión de genes diana de las rutas E2F/Rb y myc, y está silenciada en algunos tumores humanos. Además, entender las funciones biológicas reales de esta proteína era del máximo interés para la comunidad científica interesada en cromatina y epigenética. En resumen, consideramos que dedicar nuestros esfuerzos al modelo animal de L3MBTL1 nos permitía responder a preguntas competitivas de nuestro campo y de campos relacionados con el cáncer y la epigenética.

## ESTUDIOS EN CÉLULAS HUMANAS

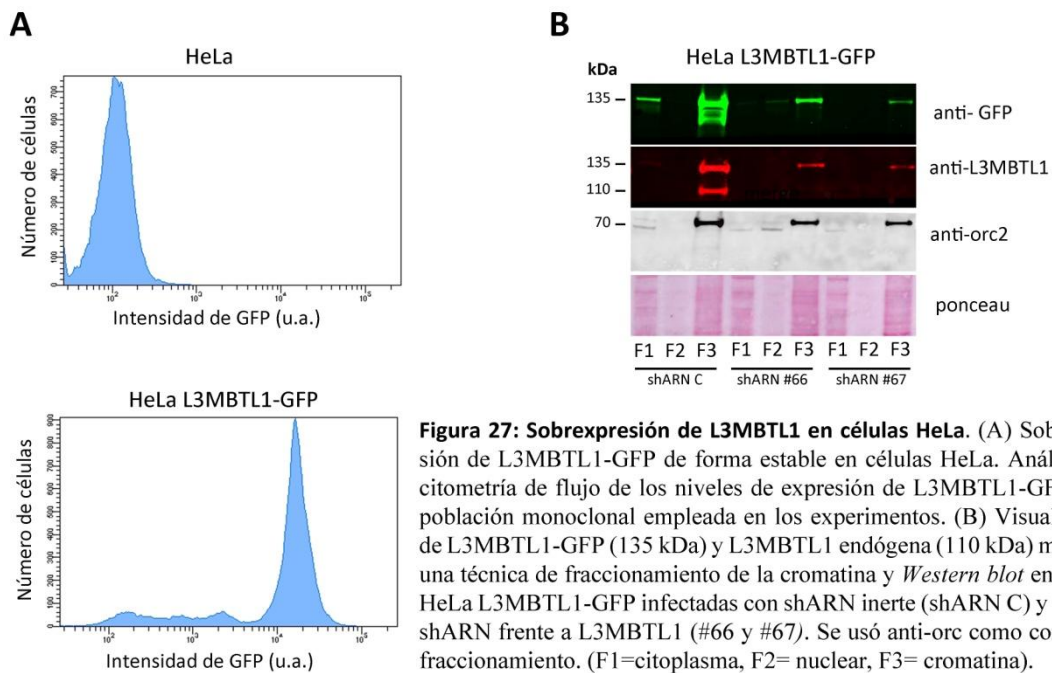
### 3.1 La ausencia de L3MBTL1 provoca alteraciones mitóticas

Paralelamente al desarrollo del modelo murino, decidimos obtener información de esta proteína *in vitro* mediante RNA interferente. Para estudiar la función biológica de L3MBTL1, disminuimos la expresión de la proteína en fibroblastos primarios humanos BJ, infectando con virus que expresan *short hairpin* ARN (shARN) contra L3MBTL1 (BJ shL3MBTL1). En paralelo, empleamos como línea control células BJ infectadas con virus que expresan un shARN inerte (BJ shcontrol). Tras la infección, observamos por RT-PCR una disminución del 90% en los niveles de ARN mensajero de L3MBTL1 (figura 26, A). Como los niveles endógenos de L3MBTL1 son muy bajos y difícilmente podríamos visualizar la disminución de la proteína por *Western blot*, empleamos los mismos virus en una línea celular estable de células HeLa con altos niveles de expresión de la proteína fusionada a GFP (figura 27, A). El análisis por citometría de flujo de los niveles de GFP mostró la reducción completa de la expresión de L3MBTL1-GFP en células infectadas con los virus productores de shARN frente a L3MBTL1 (datos no mostrados). De forma complementaria, realizamos un fraccionamiento nuclear en células HeLa L3MBTL1-GFP infectadas y análisis por *Western blot* de las proteínas en cada una de las fracciones que confirmó la eficacia del shARN en la reducción de la proteína (figura 27, B).



**Figura 26: La ausencia de L3MBTL1 provoca la parada proliferativa en células BJ.** (A) Disminución de los niveles de ARNm de L3MBTL1 en células BJ determinados por RT-PCR 4 días después de la infección con virus que expresa shARN contra L3MBTL1 (BJ shL3MBTL1) o shARN inerte (BJ shcontrol). (B) Imagen de células BJ shcontrol y BJ shL3MBTL1 6 días después de la infección. (C) Perfil de ciclo celular por citometría de flujo de células BJ shcontrol y BJ shL3MBTL1 4 días después de la infección. Los números indican el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo.

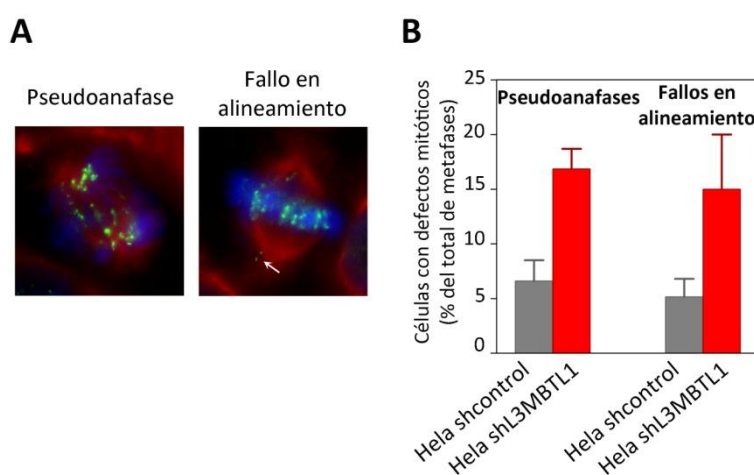
La ausencia de L3MBTL1 provocó una parada en la proliferación en células BJ y originó un aumento del tamaño celular y un gran número de vacuolas en su interior, morfología característica de células senescentes (figura 26, B). Al analizar el perfil de ciclo celular, comprobamos en BJ shL3MBTL1 la ausencia de células en fase S del ciclo y descubrimos la acumulación de la población celular en las fases G1 y G2 (figura 26, C).



**Figura 27: Sobreexpresión de L3MBTL1 en células HeLa.** (A) Sobreexpresión de L3MBTL1-GFP de forma estable en células HeLa. Análisis por citometría de flujo de los niveles de expresión de L3MBTL1-GFP en la población monoclonal empleada en los experimentos. (B) Visualización de L3MBTL1-GFP (135 kDa) y L3MBTL1 endógena (110 kDa) mediante una técnica de fraccionamiento de la cromatina y *Western blot* en células HeLa L3MBTL1-GFP infectadas con shARN inerte (shARN C) y con dos shARN frente a L3MBTL1 (#66 y #67). Se usó anti-orc como control de fraccionamiento. (F1=citoplasma, F2= nuclear, F3= cromatina).

Por lo tanto, a diferencia de lo que se podría pensar por los datos que se tienen de *Drosophila* donde los mutantes desarrollan tumores (Gateff et al. 1993), la eliminación de L3MBTL1 en células humanas no se acompaña de una hiperproliferación celular sino que genera una parada de ciclo celular y una aparente senescencia.

Datos recientes sugieren que una de las marcas principales a las que se une L3MBTL1 a través de sus dominios MBT es la monometilación de H4 en su lisina 20 (H4K20me1). Esta marca es depositada por la metiltransferasa PR-Set7. Debido a la posibilidad de que la parada de ciclo celular pudiera estar relacionada con una alteración de los niveles de H4K20me1, infectamos células HeLa en lugar de BJ. A diferencia de otras líneas celulares, la eliminación de PR-Set7 no provoca en células HeLa una parada proliferativa (Huen et al. 2008) por lo que se piensa que estas células toleran la pérdida de H4K20me1. De hecho, la infección de células HeLa con virus productores de shARN frente a L3MBTL1 produjo una disminución similar en los niveles de L3MBTL1 pero sin consecuencias en la proliferación (datos no mostrados). Varios de los mutantes de L3MBTL en mosca presentan problemas en mitosis. Además, existen evidencias de que L3MBTL1 se asocia a cromosomas mitóticos y que su sobreexpresión en células U2OS genera problemas en el desarrollo de la mitosis por la incorrecta segregación de los cromosomas (Koga et al. 1999). Para estudiar el desarrollo de la mitosis en ausencia de L3MBTL1, células HeLa shL3MBTL1 y HeLa shControl fueron tratadas con colcemida durante 4 horas para inducir su parada en metafase y posteriormente se realizó una inmunofluorescencia empleando diferentes anticuerpos que nos permitieron detectar metafases aberrantes y pseudo-anafases (figura 28).



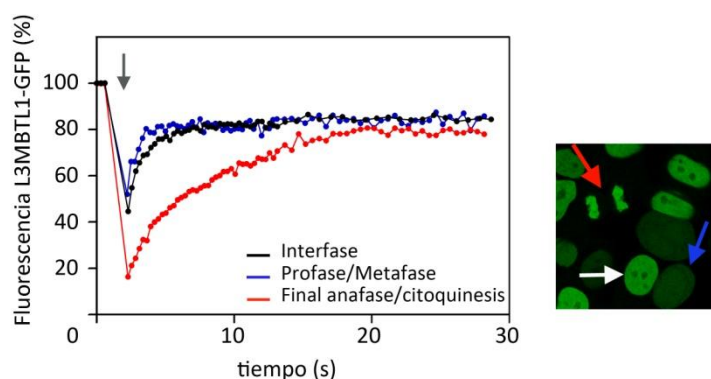
Consideramos que existía una pseudo-anafase si la orientación de los microtúbulos era perpendicular a la orientación de la separación de los cromosomas. El análisis de células en mitosis probó, en efecto, que la ausencia de L3MBTL1 genera problemas mitóticos. Al cuantificar 200 células en prometafase, metafase, anafase o pseudo-anafase, 16.9% de las células HeLa

shL3MBTL1 (frente a 6.6% en HeLa shcontrol) presentaron una configuración típica de pseudoanafase. También descubrimos un gran número de células con fallos en el alineamiento de cromosomas en la placa metafásica, 15% en HeLa shL3MBTL1 frente a 5% en HeLa shControl. En resumen, en células HeLa que son permisivas a la pérdida de H4K20me1 y L3MBTL1 en lo que se refiere a la proliferación, la ausencia de la L3MBTL1 deriva en problemas mitóticos.

### 3.2 L3MBTL1 se encuentra unida a la cromatina, con una afinidad máxima al final de anafase

Determinamos la localización de L3MBTL1 bioquímicamente mediante el fraccionamiento nuclear en células HeLa L3MBTL1-GFP (figura 27, B). La mayor parte de L3MBTL1-GFP y de L3MBTL1 endógena se encontró en la fracción de proteínas unidas a la cromatina. No observamos L3MBTL1 libre en el núcleo probablemente debido a que esta fracción proteica suele ser escasa en este ensayo, ya que sí se observó L3MBTL1 nuclear en los experimentos de microscopía de fluorescencia. La presencia de cierta cantidad de L3MBTL1-GFP en el citoplasma creemos que podría ser reflejo del proceso de fraccionamiento, ya que esto no se observaba por inmunofluorescencia (ver abajo).

Debido a los problemas que genera en mitosis la pérdida de L3MBTL1 y a las evidencias que la sitúan unida a cromosomas mitóticos, realizamos un experimento de recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*, FRAP) en la línea HeLa L3MBTL1-GFP para estudiar la dinámica de la proteína en el núcleo durante el ciclo celular (figura 29).

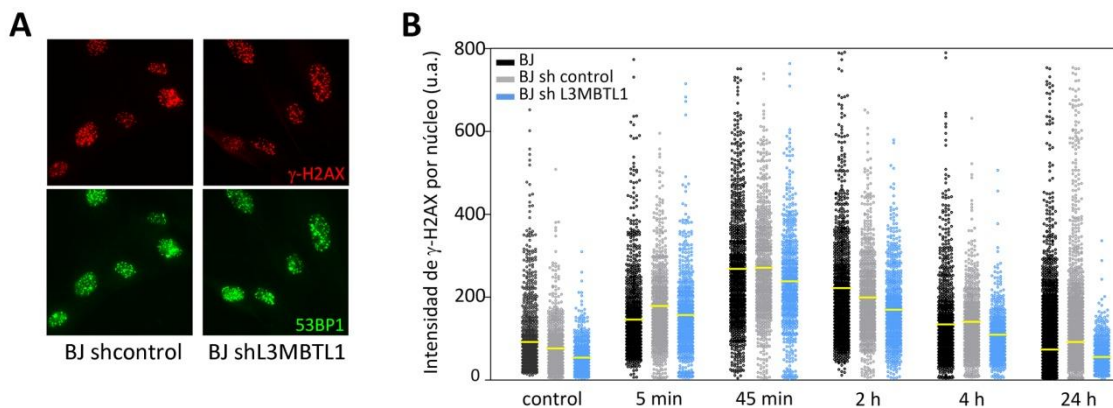


**Figura 29: Determinación de la afinidad de L3MBTL1 por la cromatina a lo largo del ciclo celular.** Gráfica de un experimento de FRAP en células HeLa L3MBTL1-GFP en diferentes fases del ciclo celular. Las flechas indican, a modo de ejemplo, células en cada una de las fases estudiadas. Flecha blanca: célula en interfase, azul: célula en los primeros momentos de mitosis (profase), roja: célula en final de anafase. En la gráfica se representa la intensidad de fluorescencia en la zona fotoblanqueada en función del tiempo, la flecha gris indica el momento donde se realizó el fotoblanqueo.

L3MBTL1 presentó una afinidad similar por la cromatina a lo largo del ciclo celular con la excepción del final de mitosis. Cuando se realizó FRAP en células que se encontraban en final de anafase, la recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo fue más lenta que en las otras fases del ciclo. Esto significa que L3MBTL1-GFP se encuentra fuertemente unida a la cromatina al final de anafase. Curiosamente es también el momento del ciclo en el que el ADN se encuentra en su estado máximo de compactación (Mora-Bermudez et al. 2007), lo que plantea la posibilidad de que L3MBTL1 participe en la condensación del ADN que se produce en las últimas fases de mitosis antes de citocinesis.

### 3.3 L3MBTL1 no se recluta a los DSB

La disminución de los niveles de la histona compactadora de la cromatina H1 había mostrado incrementar la señalización de los DSB y estimular su reparación al facilitar el acceso a las rupturas de los factores de la DDR. Nos preguntamos si, de ser L3MBTL1 un compactador global de la cromatina y que además une H1 metilada, su reducción afectaría a la señalización de los DSB. Para ello analizamos por inmunofluorescencia la formación de focos de  $\gamma$ -H2AX y 53BP1 al irradiar células BJ shControl y BJ shL3MBTL1. Ambas líneas celulares presentaron similar intensidad de  $\gamma$ -H2AX y número de focos de 53BP1 (figura 30, A). Repetimos el experimento en células HeLa infectadas con shARN frente a L3MBTL1 obteniéndose los mismos resultados (datos no mostrados).



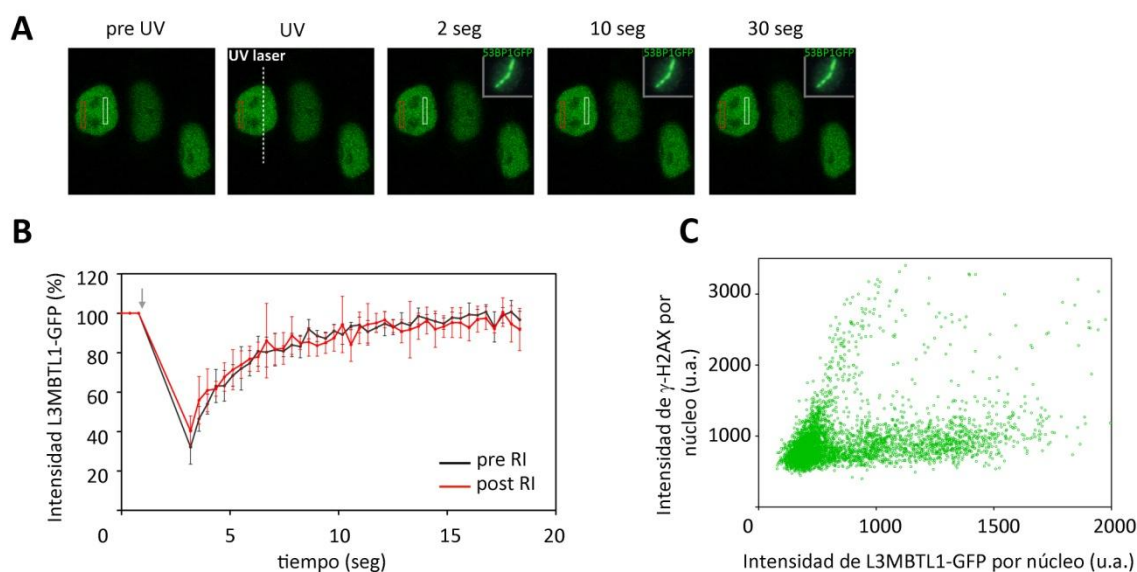
**Figura 30: La ausencia de L3MBTL1 no afecta a la DDR en células humanas.** (A) Imagen representativa de los focos de  $\gamma$ -H2AX (rojo) y 53BP1 (verde) analizados en células BJ shcontrol y BJ shL3MBTL1 30 minutos después de una irradiación de 3Gy. (B) Distribución de la intensidad de  $\gamma$ -H2AX por núcleo en células BJ, BJ shcontrol y BJ shL3MBTL1 obtenida por microscopía de alto rendimiento en poblaciones control y a diferentes tiempos tras irradiar con 3Gy.

Puesto que una disminución del estado de compactación de la cromatina facilita el acceso de las proteínas de señalización de los DSB y, como consecuencia, éstos se reparan antes, analizamos



en detalle la cinética de formación de focos y su desaparición. El experimento se realizó mediante un ensayo de microscopía de alto rendimiento tras dañar las células con 3 Gy de radiación ionizante (figura 30, B). Ante la misma dosis de daño en el ADN, las células BJ deficientes en L3MBTL1 repararon con la misma cinética los DSB, medidos como número de focos de 53BP1 (datos no mostrados) y a través de la intensidad de  $\gamma$ -H2AX (figura 30, B).

Por otra parte, hicimos uso de la línea celular que expresa L3MBTL1 fusionado a GFP para visualizar el comportamiento de L3MBTL1 tras la generación de daño en el ADN. Determinamos si L3MBTL1 acudía a los DSB empleando una técnica de microirradiación por láser que permite concentrar gran número de rupturas en una zona del núcleo (figura 31, A). Mediante esta técnica se puede observar un aumento de la fluorescencia a lo largo del recorrido del láser cuando una proteína fusionada a GFP acude a los DSB. Este aumento de fluorescencia es observado por ejemplo en el caso de células transfectadas de forma estable con 53BP1-GFP. Sin embargo, en las células HeLa L3MBTL1-GFP no se observó variación en la intensidad de fluorescencia en la zona dañada, lo que indica que L3MBTL1 no se recluta a los DSB (figura 31, A).



**Figura 31: La afinidad de L3MBTL1 por la cromatina no cambia en respuesta a daño en el ADN.** (A) Experimento de microirradiación en HeLa L3MBTL1-GFP. Las imágenes muestran una célula antes y segundos después de la generación de DSB por microirradiación con un láser UV. La línea punteada blanca marca el recorrido del láser, en el recuadro de la parte superior derecha se muestra a modo de ejemplo el reclutamiento de 53BP1-GFP tras el paso del láser. Las imágenes muestran la ausencia de un aumento de la fluorescencia en la zona microirradiada (recuadro blanco) con respecto a una zona no dañada en la misma célula (recuadro rojo), lo que indica que L3MBTL1 no acude a los DSB. (B) Análisis por FRAP de la afinidad de L3MBTL1-GFP por la cromatina tras la generación de DSB con radiación ionizante (RI). La gráfica representa la media y desviación estándar de los valores obtenidos de 5 células antes y 10 minutos después de una irradiación con 10 Gy, la flecha gris indica el momento del fotoblanqueamiento. La cinética de recuperación de la fluorescencia en una zona fotoblanqueada resultó idéntica en presencia y ausencia de daño por lo que la afinidad de L3MBTL1 por la cromatina no cambia en presencia de daño en el ADN. (C) La sobreexpresión de L3MBTL1-GFP limita la respuesta a daño en el ADN. Poblaciones celulares de HeLa con diferentes niveles de L3MBTL1-GFP fueron irradiadas con 3 Gy y procesadas por microscopía de alto rendimiento 20 minutos después. Se ha representado la distribución de las intensidades de  $\gamma$ -H2AX y GFP para cada uno de los núcleos individuales detectados.

Si bien L3MBTL1 no era reclutada a los DSB, valoramos la posibilidad de que L3MBTL1 de hecho disminuyese su afinidad por la cromatina dañada evaluando por FRAP la afinidad de L3MBTL1 por la cromatina antes y después de la generación de daño en el ADN. La cinética de recuperación de L3MBTL1 no mostró cambios tras el tratamiento de las células con radiación ionizante (figura 31, B), neocarzinostatina o hidroxiaurea (datos no mostrados).

Finalmente, y pese a que la eliminación de L3MBTL1 no parece afectar a la DDR, el análisis por microscopía de alto rendimiento del contenido por núcleo individual de L3MBTL1-GFP y  $\gamma$ -H2AX 30 minutos después irradiar una población policlonal, reveló que las células con niveles más altos de L3MBTL1 presentan menores niveles de  $\gamma$ -H2AX (figura 31, C). Este dato resulta intrigante ya que es el resultado que esperaríamos de una proteína compactadora global de la cromatina: que su sobreexpresión limitara la magnitud de la DDR, aunque consideramos que este dato puede verse afectado por niveles suprafisiológicos de expresión.

En resumen, los resultados en células humanas sugieren que L3MBTL1 es una proteína de unión a cromatina, con una afinidad máxima al final de mitosis y cuya depleción es sólo compatible con algunas líneas celulares donde tiene efectos en mitosis. En cualquier caso, no parece obvio que regule de manera global la DDR.

### 3.4 L3MBTL1 regula la expresión de un set de genes

Independientemente de su efecto en la DDR, exploramos el efecto de la falta de L3MBTL1 en el transcriptoma. Un rastreo con ARN interferente había identificado previamente a L3MBTL1 como regulador de la actividad represora de E2F (Lu et al. 2007). Actualmente diversos trabajos han demostrado que L3MBTL1 tiene actividad como represor transcripcional fundamentalmente de genes diana de E2F en células humanas, como ciclina E1 y c-myc (Lu et al. 2007; Trojer et al. 2007). L3MBTL1 ocuparía los promotores de estos genes junto con HP1 $\beta$ , en zonas donde exista H4K20me1 y H1bK26me1 (Trojer et al. 2007). Los mismos trabajos demuestran que la reducción de L3MBTL1 aumenta significativamente los niveles proteicos de ciclina E1 y c-myc. Otro gen reprimido por L3MBTL1 es RUNX1 (o AML-1), un regulador de la diferenciación hematopoyética (Sims et al. 2008). L3MBTL1, a través de la unión a H4K20me1, reprime la transcripción de AML-1, cuya desregulación está asociada con desordenes mieloproliferativos incluyendo la leucemia mieloide aguda (Heim et al. 1992). Sin embargo ningún trabajo había explorado en detalle como la eliminación de L3MBTL1 regulaba la transcripción. Para ello, decidimos explorar el papel de L3MBTL1 como regulador transcripcional mediante el análisis por *microarrays* del perfil transcripcional de células BJ infectadas con shARN contra L3MBTL1 frente a células infectadas con un shARN inerte.

Genes regulados por L3MBTL1 en células BJ		
Gen	Incremento de expresión KO vs WT	Nombre común
Genes con expresión aumentada en ausencia de L3MBTL1		
F11R	24,14	F11 receptor (F11R)
KYNU	12,94	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)
SLC27A2	10,22	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2
HSD17B2	10,18	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2
MYL7	9,45	myosin, light chain 7, regulatory
IGF1	9,38	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
ADA	7,57	adenosine deaminase
NR0B1	6,55	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1
MYLPF	6,41	fast skeletal myosin light chain 2
ANKRD1	5,80	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)
AK024898	5,53	cDNA: FLJ21245 fis, clone COL01184
PROC	5,40	protein C (inactivator of coagulation factors Va and VIIIa)
NPPB	5,30	natriuretic peptide precursor B
OTX1 *	5,14	orthodenticle homeobox 1
BCL2L11	4,95	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
C10orf93 *	4,81	chromosome 10 open reading frame 93
CHD7	4,78	chromodomain helicase DNA binding protein 7
HTR2B	4,73	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B
PPA2	4,72	pyrophosphatase (inorganic) 2
KRTAP3-1	4,71	keratin associated protein 3-1
Genes con expresión disminuida en ausencia de L3MBTL1		
LOXL1	-11,61	lysyl oxidase-like 1
TMEM132B	-10,60	transmembrane protein 132B
HAS2	-7,05	hyaluronan synthase 2
CKAP2L	-7,02	cytoskeleton associated protein 2-like
SSPN	-7,00	sarcospan (Kras oncogene-associated gene)
CCL2	-6,74	chemokine (C-C motif) ligand 2
DHRS2	-6,58	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2
ZNF179	-6,53	zinc finger protein 179
PRNP	-6,44	prion protein (p27-30) (Creutzfeldt-Jakob disease)
MALL	-6,41	mal, T-cell differentiation protein-like
AK026784	-6,39	cDNA: FLJ23131 fis, clone LNG08502
BACE1	-6,17	beta-site APP-cleaving enzyme 1
RCN2	-6,16	reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain
TPM3	-6,15	tropomyosin 3
ASPN	-5,71	sapiens asporin
MXRA5	-5,65	matrix-remodelling associated 5
C6orf65	-5,60	chromosome 6 open reading frame 65
RAB7B	-5,34	RAB7B, member RAS oncogene family
LOC283143	-5,30	cDNA FLJ33283 fis, clone ASTRO2009177
SOAT2	-5,27	sterol O-acyltransferase 2 (SOAT2)
* La expresión de los genes en rojo está regulada por impronta		

**Tabla 3: Genes regulados por L3MBTL1 en células BJ.** Lista de los 20 genes que presentan mayor aumento y disminución en su expresión en células BJ 3 días después de su infección con shARN para la eliminación de L3MBTL1. Los datos de expresión se obtuvieron de 3 *microarrays* realizados con ARN de células BJ infectadas con shARN contra L3MBTL1 y células BJ infectadas con shARN control de 3 experimentos independientes y fueron analizados por el test de *t de Student*.



La tabla 3 recoge los genes con mayores diferencias en su expresión tras la eliminación de L3MBTL1 en células BJ. La bajada en la expresión de L3MBTL1 nos sirvió para validar el experimento

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos de tres *microarrays* realizados con ARN de tres experimentos independientes, reveló que L3MBTL1 regula la expresión de un *set* determinado de genes entre los que no se encuentran c-myc, E2F, ni genes diana de E2F, tal y como se había sugerido en estudios anteriores (tabla 4). Únicamente E2F6 mostró una expresión ligeramente aumentada en ausencia de L3MBTL1. Sin embargo, confirmamos que uno de los genes regulados por L3MBTL1 es AML-1, cuya expresión se vio claramente aumentada por la ausencia de L3MBTL1. Así, si bien eramos capaces de confirmar algunos de los trabajos previos, no observamos un efecto de L3MBTL1 en la ruta E2F y c-myc.

Expresión de los genes de interés en células BJ deplecionadas en L3MBTL1		
Incremento de expresión		
Gen	KO vs WT	Nombre común
Genes con expresión significativamente alterada		
E2F6	1,50	E2F transcription factor 6 (E2F6), mRNA [NM_198256]
AML-1	4,28	Runt-related transcription factor 1 (Acute myeloid leukemia 1 protein)
L3MBTL1	-3,17	l(3)mbt-like (Drosophila) (L3MBTL), transcript variant l

**Tabla 4: Genes de interés diferencialmente expresados en células BJ tras la infección con shARN contra L3MBTL1.**

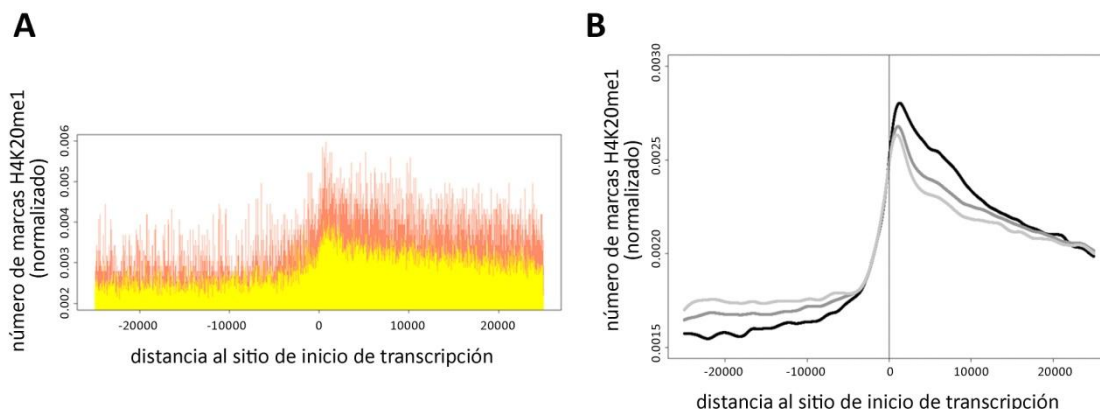
La infección con shARN contra L3MBTL1 provocó una disminución en su expresión de 3 veces comparado con células BJ infectadas con shARN control. No se observaron diferencias de expresión en genes E2F ni en sus genes diana por la eliminación de L3MBTL1 a excepción de E2F6, cuya expresión se mostró ligeramente aumentada (incremento de 1.5 respecto a células BJ infectadas con shControl). El oncogén AML-1 aumentó su expresión 4.28 veces en células BJ deplecionadas en L3MBTL1.

### 3.5 Los TSS de los genes regulados por L3MBTL1 están enriquecidos en H4K20me1

Con objeto de entender si había alguna propiedad que caracterizase a los genes regulados por L3MBTL1 y teniendo en cuenta que se le presupone una actividad de remodelación de la cromatina evaluamos su correlación con marcas epigenéticas. L3MBTL1 requiere la presencia de H4K20me1 para su unión a cromatina y su función compactadora *in vitro*. En colaboración con el grupo de bioinformática del CNIO realizamos una correlación entre los genes regulados por L3MBTL1 de acuerdo con nuestros datos de *microarrays* y la localización de la marca epigenética H4K20me1. Esta información se obtuvo a partir de un trabajo publicado en 2007 en el que se rastreó en el genoma humano la presencia de la marca H4K20me1 mediante tecnología de secuenciación Solexa (Barski et al. 2007). Se representó el número de marcas H4K20me1 a lo largo de una ventana de

## RESULTADOS

25000 pares de bases a ambos lados del sitio de inicio de transcripción (TSS) en genes regulados por L3MBTL1 y en el resto de genes presentes en el *microarray* (figura 30).



**Figura 32: Distribución de la marca epigenética H4K20me1 en genes regulados por L3MBTL1.** (A) Comparamos genes regulados por L3MBTL1 (cuya expresión aumenta o disminuye en ausencia de L3MBTL1) con  $FDR < 0.01$  en color naranja frente al resto de genes presentes en el array (amarillo). (B) A medida que disminuye la significancia estadística de los genes regulados disminuye el número de marcas H4K20me1. La línea negra representa los genes sobreexpresados en ausencia de L3MBTL1 con  $FDR < 0.05$ , la línea gris oscuro: todos los genes sobreexpresados con  $FDR > 0.05$  y la línea gris claro: los genes sobreexpresados con  $FDR > 0.5$ .

El análisis mostró que los genes regulados por L3MBTL1 se caracterizan por contener una mayor densidad de marcas H4K20me1 cerca del inicio de la transcripción. Cuanto más restrictivo fue el criterio de selección de los genes regulados por L3MBTL1, más significativa se mostró la correlación con la marca epigenética. Así, si consideramos genes regulados por L3MBTL1 con una significancia estadística baja como  $FDR > 0.5$  ( $FDR$ : tasa de falsos positivos o *false discovery rate*), genes que no están diferencialmente expresados en ausencia de L3MBTL1, el número de marcas H4K20me1 en el sitio de inicio de la transcripción es menor (figura 30, B línea gris claro) que en el caso de genes claramente sobreexpresados, con  $FDR < 0.05$  (figura 30, B línea negra). Así parece evidente que, entre otras cosas, la interacción entre L3MBTL1 y H4K20me1 es capaz de modular los niveles de expresión de los genes que presentan dicha marca epigenética en su cromatina.

En resumen, los datos en células humanas sugieren que L3MBTL1 no tiene una función en la cromatina relacionada con la DDR. Por un lado, L3MBTL1 no es movilizada a los DSB ni cambia su afinidad por la cromatina de forma global tras la generación de DSB. Tampoco parece ser compactadora global de la cromatina ya que, a diferencia de lo que ocurre al disminuir los niveles de H1, la reducción de L3MBTL1 no incrementa la señalización en los DSB ni afecta a la reparación de éstos. No obstante, niveles elevados de L3MBTL1 correlacionan con una menor fosforilación de H2AX por lo que podría limitar la señalización del daño, tal y como ocurre con la sobreexpresión de H1. Por otra parte, L3MBTL1 ha mostrado ser fundamental para el correcto

desarrollo de la mitosis, y en células primarias, esencial para la proliferación. La eliminación de PR-Set7 tiene consecuencias similares a nivel celular debido a la desaparición de la marca H4K20me1 (Oda et al. 2009). L3MBTL1 se une a H4K20me1 y ambas colocalizan en los promotores de genes diana de E2F (Tojer et al. 2007). Sin embargo, pensamos que los problemas proliferativos no están relacionados con la represión de genes E2F, como se había sugerido, ya que no hemos constatado una regulación transcripcional de estos genes por L3MBTL1. Más bien, pensamos que por su papel compactador, L3MBTL1 podría participar en la condensación cromosómica, esencial para la correcta segregación de los cromosomas, ya que ha mostrado tener máxima afinidad por la cromatina en las últimas fases de la mitosis. El hecho de que sea un set específico de genes, con una tendencia a acumular H4K20me1 en sus promotores, apunta a que el efecto compactador de esta proteína podría estar restringido a regiones del genoma ricas en dicha modificación y no a un efecto global.

## GENERACIÓN DE UN MODELO MURINO DE PÉRDIDA CONDICIONAL DE FUNCIÓN DE L3MBTL1 (L3MBTL1 CKO)

### 3.6 Descripción del constructo

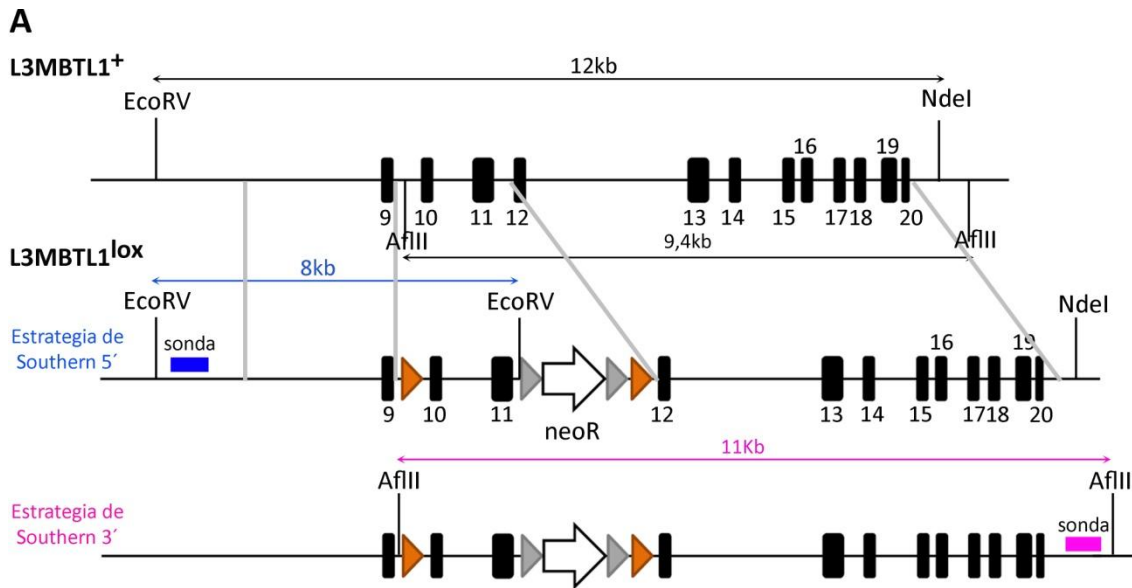
Para estudiar la función de L3MBTL1 *in vivo* decidimos generar un modelo murino condicional que permitiese circunventar la posible letalidad embrionaria por la falta de L3MBTL1. La construcción presenta dos secuencias loxP flanqueando los exones 10 y 11 del gen L3MBTL1. Bajo la expresión de una recombinasa Cre se produce la recombinación entre los dos sitios loxP y la consecuente eliminación de los exones 10 y 11 que codifican para el primer dominio MBT de la proteína. La construcción se diseñó de forma que al producirse la recombinación entre los sitios loxP, la secuencia que se genera presenta un cambio en el marco de lectura que resulta, en el caso de ser transcrita, en una proteína con una secuencia de aminoácidos distinta donde aparecen varios tripletes STOP inmediatamente después de la zona delecionada.

### 3.7 Generación del modelo

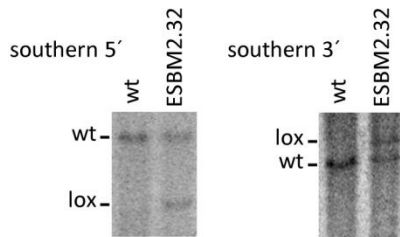
Los clones obtenidos por electroporación y selección con neomicina fueron genotipados mediante *Southern blot*. Se obtuvieron 20 clones positivos por los extremos 5' y 3' de un total de 96 clones analizados. El clon recombinante ESBM2.32 fue agregado en blastocistos de ratones silvestres para la generación de quimeras. De esta agregación nacieron 4 ratones con un índice de quimerismo entre 90 y 100%, de los cuales 3 transmitieron el alelo mutante a su descendencia. Los

## RESULTADOS

ratones heterocigotos para la construcción se cruzaron entre sí para generar ratones homocigotos *knock-out* condicionales.



## B



**Figura 33: Esquema de la construcción L3MBTL1 *knock-out* condicional y estrategia de *Southern blot*.** (A) Representación parcial del alelo L3MBTL1 silvestre y del alelo obtenido tras la recombinación homóloga. La recombinación homóloga en el lado 5' fue detectada por digestión del ADN con *EcoRV* y *NdeI* haciendo uso de un sitio *EcoRV* introducido en la construcción, mientras que para el lado 3' se digirió con *AfIII*. Esta estrategia genera fragmentos de 12 kb en el alelo silvestre y 8 kb en el condicional para el lado 5', y para el lado 3' fragmentos de 9,4 kb en el silvestre y 11 kb en el condicional. (B) Genotipado por *Southern blot* del clon ESBM2.32 que fue posteriormente agregado.

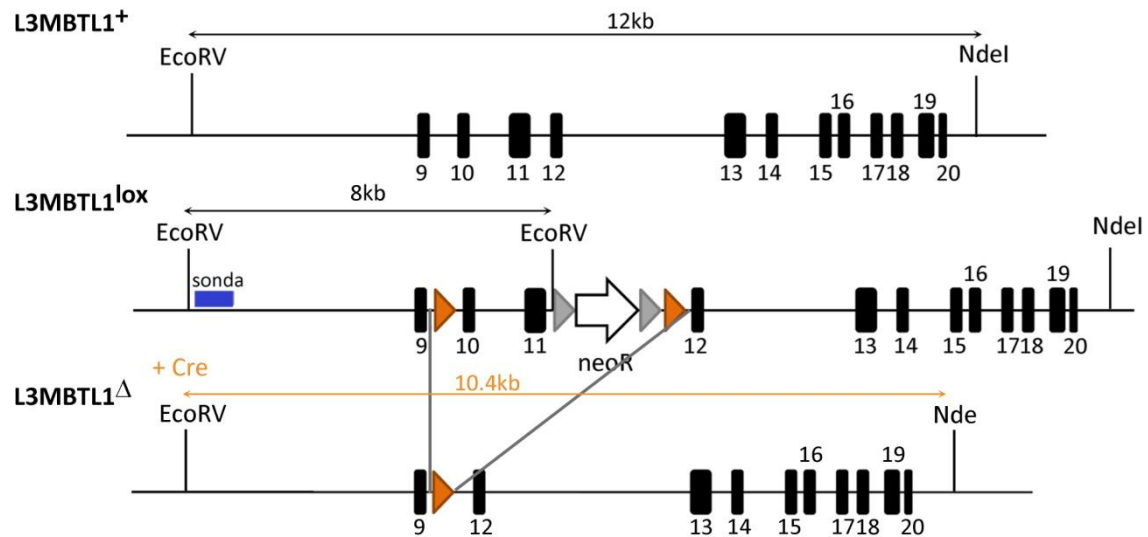
Los ratones L3MBTL1 *knock-out* condicionales fueron cruzados con modelos murinos que expresan la recombinasa cre bajo diferentes promotores con el objetivo de deleccionar el gen en todo el organismo desde el primer estado embrionario (CMV-Cre), mediante la administración de tamoxifeno en edad adulta (Cre-ERT2), o en determinados tejidos como el sistema nervioso central (Nestin-Cre y Nex-Cre) y linfocitos B (CD19-Cre).

### 3.8 Eliminación de L3MBTL1 en el ratón

Adoptamos diferentes estrategias para deleccionar L3MBTL1 en el ratón. Actualmente los cruces están en curso por lo que a continuación se discuten los diferentes modelos que se van a generar.

1) Para generar un modelo *knock-out* de L3MBTL1 (L3MBTL1<sup>ΔΔ</sup>) desde el primer momento de su desarrollo y en la totalidad de las células de su organismo cruzamos ratones L3MBTL1 cKO

con ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre pajo el promotor CMV (CMV-Cre) (Nagy et al. 1998). Del cruce de ratones  $L3MBTL1^{lox/lox}$  con ratones  $L3MBTL1^{\Delta/+}$  CMVCre<sup>T/+</sup> (ya generados) se espera el nacimiento de ratones  $L3MBTL1^{\Delta/\Delta}$  si la delección de  $L3MBTL1$  no resulta ser letal durante el desarrollo embrionario. La figura 34 ilustra la estrategia de genotipado para el alelo  $L3MBTL1^{\Delta/\Delta}$ .



**Figura 34: Estrategia de Southern blot para verificar la delección del alelo  $L3MBTL1^{\Delta/\Delta}$ .** La expresión de una recombinasa Cre provoca la recombinación entre ambos sitios loxP (triángulos naranjas) y la eliminación de los exones 10 y 11. Mediante Southern blot, por digestión del ADN con las enzimas de restricción *EcoRV* y *NdeI*, y empleando la sonda 5' podemos diferenciar entre el alelo silvestre ( $L3MBTL1^{+}$ ) de 12 kb, el alelo *knock-out* condicional ( $L3MBTL1^{lox}$ ) de 8 kb y el alelo *knock-out* ( $L3MBTL1^{\Delta}$ ) de 10,4 kb.

2) De forma paralela al cruce con CMV-Cre se está cruzando los ratones  $L3MBTL1$  cKO con ratones transgénicos UbCre-ERT2, que expresan la proteína de fusión Cre-ERT2 bajo el promotor de ubiquitina c (UbCre) (Ruzankina et al. 2007), con el objetivo de estudiar la función de  $L3MBTL1$  en el organismo adulto y evitar la posible letalidad por la eliminación de  $L3MBTL1$  durante el desarrollo embrionario. Cre-ERT2 se compone de la recombinasa Cre y una forma mutante del receptor de estrógenos que puede ser activada de forma selectiva únicamente en presencia de tamoxifeno pero no de estrógenos.

3) Los mutantes de *Drosophila* para  $L3MBTL1$  presentan tumores cerebrales que provocan la muerte en fase larvaria. Pensando que la función de la proteína pueda residir en el cerebro, cruzamos nuestro modelo condicional de  $L3MBTL1$  con dos modelos murinos que expresan la recombinasa Cre en el sistema nervioso central. Por un lado se han comenzado los cruces con ratones transgénicos Nestin-Cre (Tronche et al. 1999), que expresan la recombinasa bajo el promotor nestina de rata. La actividad recombinasa de Cre está fuertemente presente desde el día

11 de desarrollo embrionario en médula espinal y cerebro, y en el ratón adulto Cre se expresa tanto en sistema nervioso central como en periférico y en algunas células de riñón y corazón. Por otro lado, cruzamos los ratones L3MBTL1 cKO con ratones transgénicos Nex-Cre con expresión de la recombinasa Cre bajo control del *locus* Nex (Goebbels et al. 2006). En este modelo la expresión de la recombinasa está restringida a las neuronas principales del neocortex y del hipocampo desde el día 12 del desarrollo embrionario. En cualquier caso, todos estos cruces se mantienen en bajo número hasta verificar si realmente los *knock-out* constitutivos son viables, en cuyo caso no serían necesarios.

Independientemente del resto de los cruces que están en marcha, y con objeto de obtener poblaciones celulares puras de células deficientes en L3MBTL1, para esta Tesis hemos podido realizar una caracterización inicial de linfocitos B y células madre embrionarias (ES) knock-out para L3MBTL1.

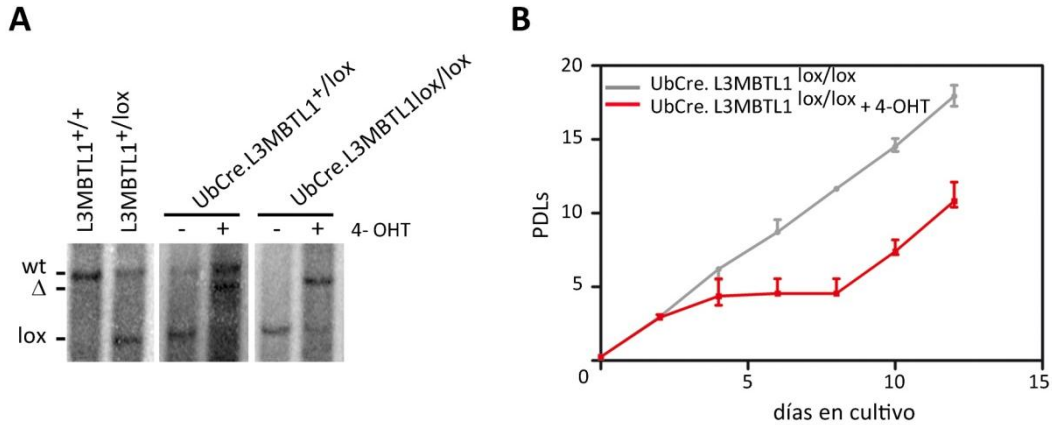
### 3.9 Eliminación de L3MBTL1 en células embrionarias murinas

Con la ayuda de la unidad de Transgénicos del CNIO, se generaron células embrionarias murinas UbCre-ERT2/L3MBTL1<sup>lox/lox</sup> (también denominados UbCre.L3MBTL1<sup>lox/lox</sup>) a partir de blastocitos de 3.5 días. Tal y como se ha explicado, el sistema UbCre-ERT2 permite la expresión de la recombinasa Cre en respuesta a tamoxifeno. Así, las células se trataron durante 7 días con 4-OHT 1  $\mu$ M en cultivo para conseguir la escisión completa de L3MBTL1 (figura 35). Como control se emplearon las mismas células sin tratar con 4-OHT.

#### L3MBTL1 no es esencial para la proliferación en células ES murinas

La eliminación de L3MBTL1 había mostrado inducir una parada del ciclo celular en células humanas primarias BJ. En vistas a la generación de un ratón *knock-out*, resultaba fundamental saber si L3MBTL1 es esencial para la proliferación de células ES murinas. Realizamos una curva de crecimiento siguiendo el protocolo 3T3 (ver materiales y métodos) con tres cultivos independientes de células ES UbCre.L3MBTL1<sup>lox/lox</sup> sin tratamiento y bajo tratamiento con 4-OHT 1  $\mu$ M. En la figura 35 se ha representado el perfil de acumulación de divisiones celulares tras el pase seriado en cultivo. Si bien se observó un crecimiento más lento en las células ES entre el tercer y séptimo día de tratamiento con 4-OHT, esto también ocurre al tratar células UbCre.L3MBTL1<sup>lox/+</sup>, por lo que podría ser un efecto colateral al tratamiento. Sin embargo, a partir del día 7 de tratamiento las células *knock-out* crecen con normalidad a un ritmo idéntico al de células control.

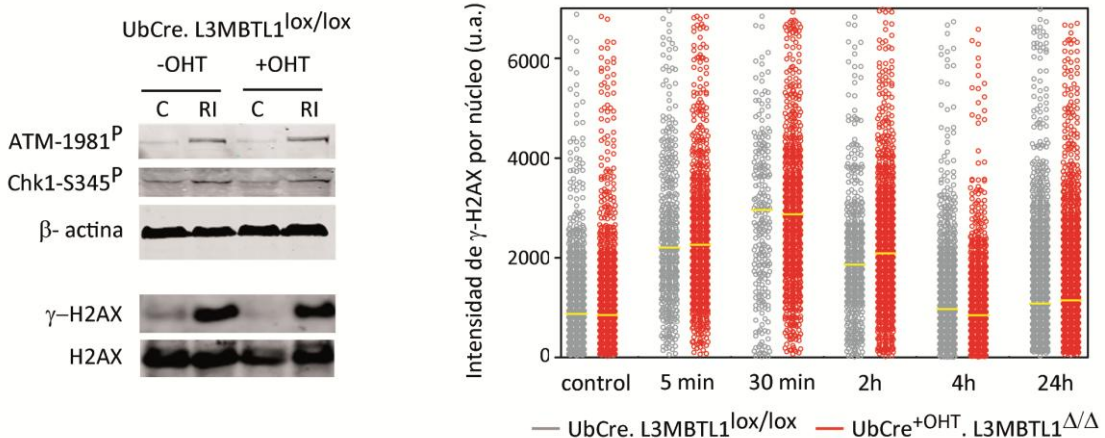




**Figura 35: Las células ES murinas proliferan en ausencia de L3MBTL1.** (A) Análisis por *Southern blot* de la delección de L3MBTL1 en células ES murinas UbCre.L3MBTL1<sup>lox/+</sup> y UbCre.L3MBTL1<sup>lox/lox</sup> tras 7 días en cultivo con 4-OHT. Se empleó la sonda 5' (descrita en materiales y métodos) que permite visualizar la banda silvestre (wt) de 12 kb, la banda condicional (lox) de 8 kb y la banda *knock-out* (Δ) de 10 kb. (B) Perfil de acumulación de divisiones (PDL) tras el pase seriado en cultivo (protocolo 3T3) de células ES murinas UbCre.L3MBTL1<sup>lox/lox</sup> sin tratamiento (gris) y bajo tratamiento con 4-OHT (rojo).

### La delección de L3MBTL1 en células ES murinas no afecta a la DDR

En el caso de que L3MBTL1 sea un compactador global de la cromatina, esperamos que su eliminación en células ES genere una relajación de la cromatina que estimulará la DDR, tal y como observamos en las células H1<sup>50</sup>. Sin embargo, el análisis por *Western blot* de la fosforilación de ATM, Chk1 y H2AX, tras la generación de DSB con 3 Gy de RI, mostró que la señalización de los DSB por las rutas moleculares de ATM y ATR permanece intacta en ausencia de L3MBTL1.

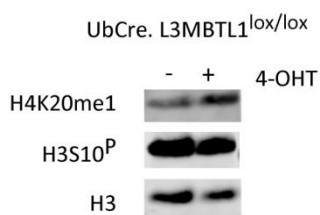


**Figura 36: La ausencia de L3MBTL1 en células embrionarias de ratón no afecta a la DDR.** (A) Análisis por *Western blot* de los niveles de ATM, ATM-1981P, Chk1, Chk1-S345P, H2AX y γ-H2AX en extractos de células embrionarias murinas UbCre.L3MBTL1<sup>lox/lox</sup> y UbCre.L3MBTL1<sup>Δ/Δ</sup> (obtenidas por tratamiento con 4-OHT) irradiadas con 5 Gy y no irradiadas. (B) Distribución de la intensidad de γ-H2AX en células UbCre.L3MBTL1<sup>Δ/Δ</sup> y UbCre.L3MBTL1<sup>lox/lox</sup> obtenida por microscopía de alto rendimiento en poblaciones control y a diferentes tiempos tras irradiar con 3 Gy.

Del mismo modo, evaluamos si la ausencia de L3MBTL1 afecta a la reparación de las rupturas ya que células con una estructura de la cromatina más abierta reparan antes los DSB. La reparación de DSB fue medida por microscopía de alto rendimiento a través del análisis de la cinética de fosforilación de  $\gamma$ -H2AX. Tal y como puede observarse en la figura 36, ambas líneas celulares presentaron una cinética de fosforilación de  $\gamma$ -H2AX y desaparición de la señal similar. Estos resultados ponen en duda la posibilidad de que L3MBTL1 sea un compactador global de la cromatina ya que, en contra de lo esperado, su ausencia en células ES no aumenta la señalización de los DSB ni estimula la reparación de las rupturas.

### La delección de L3MBTL1 en células ES murinas incrementa los niveles de H4K20me1.

A través del reconocimiento de H4K20me1, L3MBTL1 compacta la cromatina *in vitro* y se une a promotores de diversos genes actuando de represor transcripcional (Trojer et al. 2007). *In vivo*, se ha demostrado que L3MBTL1 mantiene reprimida la expresión de RUNX1 a través del reconocimiento de esta marca. Por otra parte, estudios sin publicar, muestran que L3MBTL1 colocaliza con PR-Set7 (enzima que monometila H4K20me1) y plantean que L3MBTL1 podría ser esencial para la deposición de la marca por PR-Set7. Debido a la incertidumbre que existe sobre la dependencia de ambas proteínas, analizamos los niveles de H4K20me1 en ausencia de L3MBTL1 en células ES UbCre.L3MBTL1<sup>lox/lox</sup> y UbCre.L3MBTL1<sup>Δ/Δ</sup>. La falta de L3MBTL1 no disminuyó los niveles de H4K20me1, más bien, en contra de lo esperado, los niveles fueron ligeramente superiores que en células control. Puesto que la cantidad de H4K20me1 varía durante el ciclo celular (se adquiere en G2, alcanza sus niveles máximos en mitosis y desaparece durante G1) comprobamos que no existían diferencias significativas en la tasa mitótica de ambas líneas. La tasa mitótica se midió indirectamente con los niveles de H3S10<sup>P</sup>, marca que se adquiere al entrar las células en mitosis y, si acaso, las células delecionadas mostraban menor cantidad de H3S10<sup>P</sup> que las control (figura 37). Así, la eliminación de L3MBTL1 deriva en una acumulación de H4K20me1, lo que podría deberse a un efecto de *feedback loop*, al perder la proteína efectora de la represión mediada por dicha modificación.

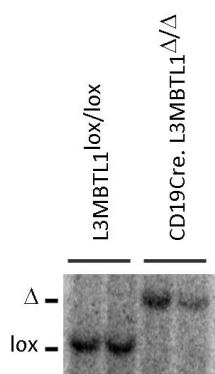


**Figura 37: La eliminación de L3MBTL1 en células ES murinas aumenta los niveles celulares de H4K20me1.** Análisis por *Western blot* de los niveles de H4K20me1 y H3S10<sup>P</sup> en extractos de células ES UbCre.L3MBTL1<sup>lox/lox</sup> y UbCre.L3MBTL1<sup>Δ/Δ</sup>. Como control de carga se midieron los niveles de H3.



### 3.10 Eliminación de L3MBTL1 en linfocitos B

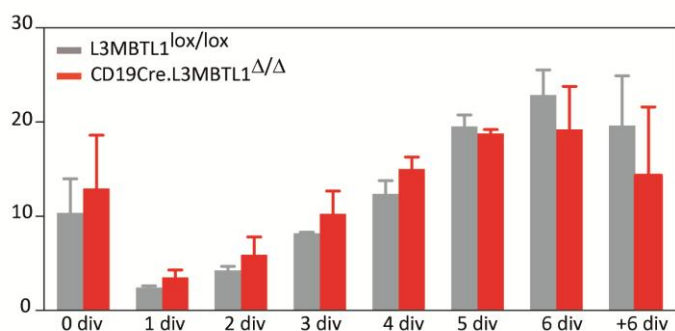
Decidimos eliminar L3MBTL1 en linfocitos B por cruces con ratones CD19-Cre en los que la expresión de Cre ocurre en las células pro-B y a lo largo de las siguientes fases de desarrollo de las células B bajo el promotor endógeno de CD19. Se trata de un sistema muy utilizado en el laboratorio por el que se consiguen linfocitos B con un 100% de delección del gen condicional y que fácilmente se pueden extraer y mantener en cultivo para la realización de experimentos *ex-vivo*. Mediante cruces de ratones L3MBTL1<sup>lox/lox</sup> y ratones L3MBTL1<sup>lox/lox</sup> CD19Cre<sup>+/K1</sup>, generamos ratones control L3MBTL1<sup>lox/lox</sup> y ratones *knock-out* específicamente en células B (CD19Cre.L3MBTL1<sup>Δ/Δ</sup>) en proporciones mendelianas. Los linfocitos B fueron aislados y mantenidos en cultivo con la estimulación pertinente para su proliferación tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos. El análisis por *Southern blot* mostró que los linfocitos B presentan un 100% de delección del alelo L3MBTL1<sup>lox</sup> para dar lugar al alelo L3MBTL1<sup>Δ</sup> (figura 38).



**Figura 38: Los linfocitos B CD19Cre.L3MBTL1<sup>Δ/Δ</sup> presentan 100% de escisión del gen L3MBTL1.** *Southern blot* realizado con ADN extraído de linfocitos B L3MBTL1<sup>lox/lox</sup> y CD19Cre.L3MBTL1<sup>Δ/Δ</sup> tras su aislamiento y mantenimiento durante dos días en cultivo celular. Se empleó la sonda 5', descrita en materiales y métodos, que permite visualizar la banda de 10 kb (Δ) generada por recombinación entre los dos sitios lox de la construcción y la banda lox de 8 kb.

#### Los linfocitos B deficientes en L3MBTL1 presentan una proliferación normal

Los ratones CD19Cre.L3MBTL1<sup>Δ/Δ</sup> presentaron un bazo de tamaño normal con un número de células totales y un porcentaje de linfocitos B similar a un ratón silvestre. Tras marcar las células B con CFSE (5,6 ester succinimidil diacetato carboxifluoresceína) y mantenerlas en cultivo estimuladas con LPS, medimos su proliferación por citometría a través de la pérdida de fluorescencia de CFSE (figura 39). Los resultados mostraron que los linfocitos CD19Cre.L3MBTL1<sup>Δ/Δ</sup> presentan un número de divisiones tras 4 días en cultivo comparable a los linfocitos B L3MBTL1<sup>lox/lox</sup> lo que demuestra que L3MBTL1 no es necesaria para la proliferación de linfocitos B.



**Figura 39: Los linfocitos B proliferan normalmente en ausencia de L3MBTL1.** Se marcaron las células con CFSE para seguir el número de divisiones celulares. Después de 4 días en cultivo con LPS se midió el porcentaje de células según el número de divisiones que había llevado a cabo como medida de proliferación. Se ha representado la media y desviación estándar de 3 ratones L3MBTL1<sup>lox/lox</sup> y 3 ratones CD19Cre. L3MBTL1<sup>Δ/Δ</sup>.

### Perfil transcripcional de células B deficientes en L3MBTL1

Puesto que existen evidencias que apuntan a un papel represor de la transcripción de L3MBTL1, y que en este modelo conseguimos una delección total en ausencia de alteraciones significativas en la proliferación, exploramos la ruta transcripcional regulada por L3MBTL1 en nuestro modelo genético. Para ello, estudiamos el impacto que la eliminación de L3MBTL1 tiene en la transcripción génica por *microarrays* de expresión en linfocitos B *knock-out* para L3MBTL1 con respecto a linfocitos B control tras dos días en cultivo con LPS e IL-4 (tabla 5). Los resultados obtenidos por 3 *microarrays* realizados con 3 parejas de ratones se validaron al constatar que, entre los 40000 genes que contiene el *array*, el cuarto gen con mayor bajada en su expresión fue L3MBTL1. De la misma manera que ocurrió en células BJ, la ausencia de L3MBTL1 no afectó a la expresión de E2F ni myc. En conjunto, nuestros datos en ambos modelos nos permiten descartar un papel de L3MBTL1 como regulador de la ruta de E2F.

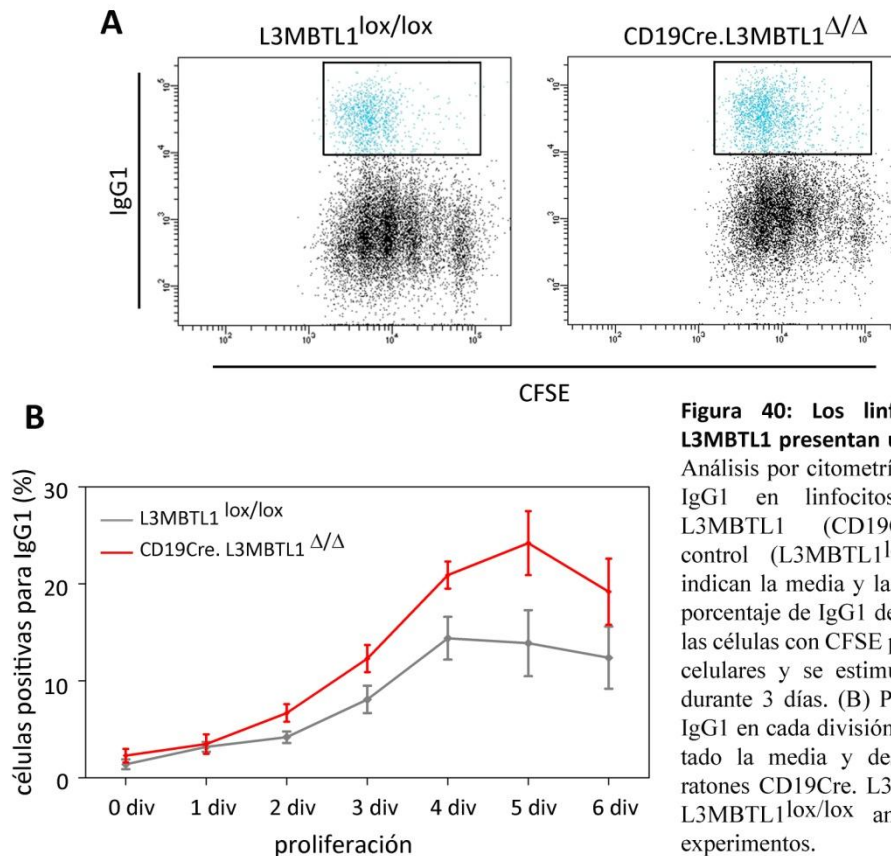
Genes con la expresión alterada en células B L3MBTL1 <sup>Δ/Δ</sup>		
Gen	Incremento de expresión KO vs WT	Nombre común
Genes con la expresión aumentada en células B L3MBTL1 <sup>Δ/Δ</sup>		
Mbnl1	3,73	2 days neonate thymus thymic cells cDNA, muscleblind-like (Drosophila)
Olfr1515	2,73	olfactory receptor 1515
B3galnt1	2,66	UDP-GalNAc:betaGlcNAc beta 1,3-galactosaminyltransferase, polypeptide 1
Padi3	2,54	peptidyl arginine deiminase, type III
Smo	2,42	smoothened homolog (Drosophila)
2610035D17Rik	2,28	13 days embryo forelimb cDNA, clone:5930429B03
AF139595	2,24	Mash2 gene
Ptpn22	2,22	protein tyrosine phosphatase, receptor type, J
Nefh	2,21	neurofilament, heavy polypeptide
Ppp1r2	2,18	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2
AK040223	2,17	0 day neonate thymus cDNA, clone:A430079A06
Saa3	2,14	serum amyloid A 3
5830458C19Rik	2,13	adult male thymus cDNA, clone:5830458C19
5830462O15Rik	2,10	adult male thymus cDNA, clone:5830462O15
AK086528	2,10	15 days embryo head cDNA, clone:D930034N17
Ywhaz	2,07	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein
Grhl2	2,05	grainyhead-like 2 (Drosophila)
Rfwd2	1,98	7 days neonate cerebellum cDNA, clone:A730008F16
AK041510	1,94	3 days neonate thymus cDNA, ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)
Armc9	1,91	armadillo repeat containing 9 (Armc9)
Genes con expresión disminuida en células B L3MBTL1 <sup>Δ/Δ</sup>		
Magi1	12,46	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1
AK052115	7,46	12 days embryo eyeball cDNA
L3mbtl1	7,08	adult male hippocampus cDNA
Naip5	7,07	NLR family, apoptosis inhibitory protein 5
Slc16a6	3,17	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 6
Crhbp	3,11	corticotropin releasing hormone binding protein
Cuedc1	2,87	CUE domain containing 1
Naip2	2,86	NLR family, apoptosis inhibitory protein 2
Ighg	2,70	Immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide)
Slc15a2	2,70	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2
Epdr1	2,53	ependymin related protein 1 (zebrafish)
Mme11	2,37	membrane metallo-endopeptidase-like 1
Olfr339	2,32	olfactory receptor 339
Cdk5rap1	2,32	CDK5 regulatory subunit associated protein 1
Arl5c	2,24	adult male olfactory brain cDNA
Dock10	2,22	3 days neonate thymus cDNA
Dnahc7c	2,21	PREDICTED: Mus musculus dynein, axonemal, heavy chain 12 (Dnahc12)
Gpr177	2,20	G protein-coupled receptor 177
Tnni1	2,08	troponin I, skeletal, slow 1
Casp4	2,03	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
Cd5l	2,01	CD5 antigen-like

**Tabla 5: Perfil transcripcional de linfocitos B L3MBTL1<sup>Δ/Δ</sup>.** Se realizaron 3 *microarrays* comparando linfocitos B de ratones hermanos L3MBTL1<sup>lox/lox</sup> y CD19Cre. L3MBTL1<sup>Δ/Δ</sup> (6 ratones en total). se determinó la media de los datos obtenidos de los 3 *microarrays* para cada gen y se analizaron los datos por el test estadístico de *t* de Student.

### Los linfocitos B deficientes en L3MBTL1 presentan un CSR aumentado

Los resultados de la eliminación de L3MBTL1 en células humanas y murinas sugieren que L3MBTL1 no es un gen esencial para la compactación global de la cromatina, la regulación de la transcripción, la proliferación celular ni la DDR a nivel global. Sin embargo, su función podría estar ligada a la presencia de H4K20me1, marca que reconoce L3MBTL1 para compactar la cromatina *in vitro*. Cabe mencionar que estudios recientes de proteómica han revelado que prácticamente la totalidad de la histona H4 en la cromatina está cubierta de la forma dimetilada de H4K20 (H4K20me2) por lo que la distribución de H4K20me1 podría estar limitada a zonas muy concretas del genoma. Además, del estudio en células BJ descubrimos que los genes que regula transcripcionalmente L3MBTL1 están enriquecidos en H4K20me1. Todos estos datos sugieren que, pese a que L3MBTL1 no sea un compactador de la cromatina a modo global, quizás si lo sea en *loci* concretos en los que su ausencia podría favorecer la recombinación.

En este sentido, el grupo de A. Nussenzweig, con quién colaboramos, nos facilitó datos de *ChIP sequencing* de H4K20me1 realizados en linfocitos B estimulados dos días en cultivo con LPS e IL4. Entre los genes enriquecidos específicamente en esta marca se encuentra la cadena pesada de inmunoglobulinas (IgH). Así, para analizar si L3MBTL1 puede tener una función en la señalización y reparación de los DSB *in vivo*, estudiamos uno de los procesos fisiológicos que requieren la ruptura y reparación del ADN: el cambio de isotipo de la región constante de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (CSR o *Class Switch Recombination*). El proceso de CSR requiere la recombinación de los genes que codifican para los distintos isotipos de inmunoglobulinas (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) para la producción de anticuerpos con funciones efectoras diferentes. Estimulamos linfocitos B aislados del bazo de ratones L3MBTL1<sup>lox/lox</sup> (control) y ratones CD19Cre. L3MBTL1<sup>Δ/Δ</sup> con LPS e IL-4 durante 3 días en cultivo para inducir CSR desde IgM hacia IgG1. Tras 96 horas en cultivo, los linfocitos estimulados se tiñeron para detectar marcadores de superficie y determinar la eficacia del CSR hacia IgG1 por citometría de flujo. Los linfocitos deficientes en L3MBTL1 presentaron mayor CSR hacia IgG1 ( $14.8 \pm 1.3$ ) que los linfocitos control ( $9.6 \pm 1.8$ ) (figura 40, A). Como la eficiencia de CSR depende de la correcta estimulación de los linfocitos y de su grado de proliferación, tuvimos que descartar posibles diferencias de proliferación entre ambos genotipos. Los linfocitos B se marcaron con CFSE para seguir las divisiones celulares por la dilución del colorante fluorescente. Así, determinamos el porcentaje de IgG1 producida en cada número de división celular (detectadas por la intensidad de fluorescencia emitida por el CFSE) en ambos genotipos y observamos que los mayores niveles de CSR en los linfocitos *knock-out* se conservaban en todas las divisiones celulares (figura 40, B).



**Figura 40: Los linfocitos deficientes en L3MBTL1 presentan un CSR aumentado.** (A) Análisis por citometría de flujo de CSR hacia IgG1 en linfocitos B *knock-out* para L3MBTL1 (CD19Cre.L3MBTL1 $\Delta/\Delta$ ) y control (L3MBTL1 $lox/lox$ ). Los números indican la media y la desviación estándar del porcentaje de IgG1 de 3 ratones. Se marcaron las células con CFSE para seguir las divisiones celulares y se estimularon con LPS e IL-4 durante 3 días. (B) Porcentaje de CSR hacia IgG1 en cada división celular. Se ha representado la media y desviación estándar de 3 ratones CD19Cre. L3MBTL1 $\Delta/\Delta$  y 3 ratones L3MBTL1 $lox/lox$  analizados en diferentes experimentos.

En este momento aún no sabemos el mecanismo molecular por el cual los linfocitos carentes de L3MBTL1 muestran un fenotipo de “hiperCSR” y hay muchas cosas que podrían verse afectadas (niveles de las enzimas involucradas en el proceso, accesibilidad de las enzimas que cortan el locus, mayor reparación de las rupturas generadas, etc...). El estudio de estas posibilidades forman parte de nuestra investigación en un futuro próximo. Sin embargo, cabe mencionar que esta es la primera vez que se describe una mutación capaz de estimular el proceso de CSR por encima de condiciones normales, lo que lo convierte en un fenómeno muy atractivo para su investigación.



# DISCUSIÓN





## DISCUSIÓN

En la presente Tesis hemos querido estudiar la DDR desde un punto de vista poco común: el de la configuración de la cromatina en la zona de la lesión. Como todo proceso que tiene como molde el ADN, la maquinaria de la DDR tiene que lidiar con la compleja estructura altamente compactada de la cromatina, donde está embebido el ADN. Estudiamos la influencia de la configuración de la cromatina por tres líneas de actuación diferentes. (1) La regulación de ATR por ATM en respuesta a DSB. Los resultados obtenidos de este primer trabajo sugerían que la señalización por ATR dependía de la interacción de esta quinasa con la cromatina. De este modo, decidimos evaluar cómo la señalización de daño en el ADN podría estar influenciada por la naturaleza de la cromatina que rodea a la lesión. (2) Haciendo uso de un modelo genético de disminución de histona linker H1, constatamos que la relajación de la cromatina a nivel global aumenta la señalización en cada DSB confiriendo a las células mayor resistencia a los DSB. Esto se traduce en un incremento de la recombinación homóloga lo que deriva en un alargamiento de los telómeros (Murga et al. 2007). Finalmente, (3) nos resultó muy atractiva la posibilidad de poder disminuir la compactación de la cromatina en un modelo animal para así poder evaluar su relevancia fisiológica. En este modelo podríamos evaluar las consecuencias de abrir la cromatina en el mantenimiento del genoma, y por extensión en la esperanza de vida de los animales y en su predisposición a desarrollar cáncer. Para que este objetivo fuese realizable, teníamos que hallar una proteína cuya mutación pudiese afectar de forma significativa a la compactación de la cromatina. La proteína elegida fue L3MBTL1, única proteína que había mostrado tener una función compactadora de la cromatina *in vitro* (Trojer et al. 2007). Si bien el trabajo durante estos años ha ido poniendo de manifiesto que L3MBTL1 seguramente sea un regulador local más que global de la cromatina, los resultados en recombinación en células B sugieren que un incremento de la accesibilidad es capaz de estimular la reparación de lesiones programadas en *loci* específicos.

## 1. Relación entre ATM y ATR

### 1.1 Necesidad de un nuevo modelo para la respuesta a daño en el ADN inducido por radiación ionizante

Hasta el momento de comenzar esta Tesis, el conocimiento que se tenía de la activación de la DDR a nivel molecular colocaba a las dos principales quinasas responsables de señalar los DSB en dos rutas independientes. El modelo aceptado proponía que el ssDNA generado por estrés replicativo, es reconocido por ATR, mientras que ATM es la quinasa encargada de señalar los DSB que no están restringidos a células en replicación. De esta forma se explicaba como ATM está involucrada en la activación de todos los *checkpoints* (Lavin et al. 2005). Según el modelo, la

respuesta al daño en el ADN se amplifica después con la activación de otras quinasas: ATM fosforila a Chk2 y ATR a Chk1.

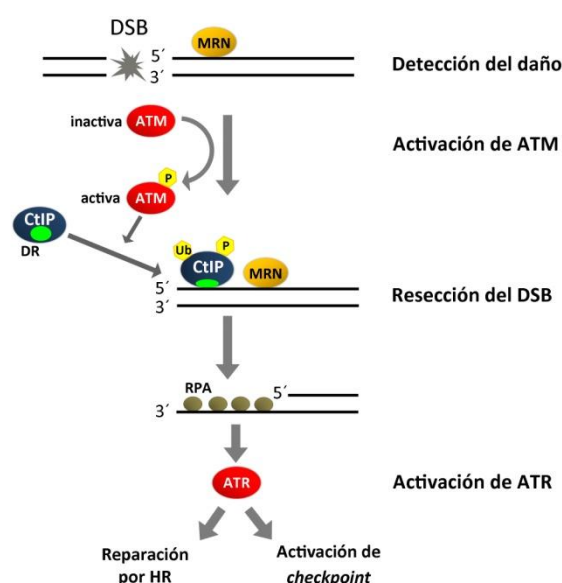
Algunos estudios, sin embargo, constataron la presencia de Chk1 fosforilado en células tratadas con radiación ionizante (método que no es exclusivo de células en replicación sino que produce DSB en todas las células, y que se utiliza en el laboratorio para activar a ATM). En estos trabajos las dosis de radiación ionizante empleadas no eran lo suficientemente altas como para pensar en una fosforilación accidental de Chk1 por ATM en presencia de gran cantidad de DSB. Más bien, puesto que ya se había observado que ATR y Chk1 participaban en la regulación del *checkpoint* G2/M en respuesta a radiación ionizante (Liu et al. 2000; Cliby et al. 1998; Brown et al. 2003), pensamos que Chk1 podía tener un papel funcional en la respuesta a radiación.

### 1.2 ATM controla la activación de ATR en células irradiadas

El trabajo presentado en esta Tesis aclaró la secuencia de eventos que lleva a la fosforilación de Chk1 cuando las células son irradiadas. Aunque ATM es la quinasa que se activa ante DSB producidos por radiación ionizante, su activación no es suficiente para fosforilar a Chk1. La fosforilación de Chk1 sigue requiriendo ATR. Nuestro trabajo revela la existencia de una interacción entre las dos quinasas ATM y ATR para la activación de Chk1 en respuesta a radiación ionizante que funciona de manera que ATM controla la activación de ATR. Al contrario de lo que ocurre con ATM, que puede encontrarse activada en extractos proteicos de células irradiadas, al purificar ATR de células dañadas nunca se ha encontrado ATR intrínsecamente activa (Chiang et al. 2004). Por esta razón, no creímos que ATM estuviese promoviendo la actividad quinasa de ATR. Sin embargo, puesto que el reclutamiento al ADN es el evento clave para la activación de muchas PIKKs (Falck et al. 2005; Lukas et al. 2003), exploramos si ATM estaba implicada en el reclutamiento de ATR a las lesiones en condiciones de radiación ionizante. La evaluación de la carga de ATR a la cromatina, por un protocolo de fraccionamiento y visualización de proteínas unidas a cromatina, reveló que el reclutamiento de ATR dependía de ATM en células irradiadas.

En la célula, ATR se encuentra formando un complejo con ATRIP (Cortez et al. 2001) y su reclutamiento a los DSB se produce por interacción del complejo con ADN de cadena simple recubierto por RPA (Zou and Elledge 2003). ATM podría regular la activación de ATR en alguno de estos pasos (en la generación de ADN de cadena sencilla, en la modificación de RPA o ATRIP,...). En efecto, los estudios de localización mostraron que ATM regula la redistribución de RPA en *foci* cuando las células son irradiadas. Con este dato confirmamos que el control de ATM sobre la ruta ATR/Chk1 se produce a nivel de la relocalización de RPA en la cromatina (Cuadrado et al. 2006). El trabajo publicado simultáneamente por el grupo liderado por S. Jackson sugirió que el reclutamiento tanto de ATR como de RPA a los DSB inducido por radiación ionizante depende

del complejo MRN (Jazayeri et al. 2006). Como este complejo participa en la carga de ATM en las lesiones (Falck et al. 2005), esta idea podría sin embargo ser equivalente a la dependencia de ATM. Jazayeri y colaboradores demostraron que una mutación puntual en la nucleasa Mre11, que no afecta a la activación de ATM, anula la carga de RPA al ssDNA. Hoy se sabe que el control sobre la activación de ATR se produce a nivel de la resección de los DSB: la proteína CtIP se transloca a los DSB mediante un proceso que depende del sensor MRN, de la actividad quínasa de ATM y de un dominio de unión a la cromatina que presenta CtIP. En los DSB, CtIP promueve la resección 5'→3' necesaria para la generación de ssDNA y unión de RPA (You et al. 2009) (figura 41).



**Figura 41: Modelo de resección de DSB y reclutamiento de CtIP.** En respuesta a un DSB, el complejo sensor MRN recluta a ATM a la cromatina que flanquea a la ruptura y ATM es activada. Una vez activa, ATM promueve el reclutamiento de CtIP al DSB, posiblemente por fosforilación de CtIP. MRN también facilita el reclutamiento de CtIP. Además de ATM y MRN, CtIP requiere de su dominio DR de unión a DNA para reclutarse al DSB. En la ruptura, CtIP coopera con MRN para promover la resección de la hebra 5' generando una cadena de ssDNA 3' a la que se une RPA. El ssDNA recubierto por RPA es la señal de activación de ATR (adaptado de You et al. 2009).

Ambos trabajos propusieron que existe una conexión entre ambas rutas de señalización de forma que ATM controla el reclutamiento de ATR a las rupturas generadas por radiación ionizante. Actualmente se sabe que no solo ATM y ATR están conectadas, sino que existe una interconexión entre las tres quinasas implicadas en la DDR. Recientemente se ha descubierto que DNA-PKcs y ATR son capaces de suplir algunas funciones de ATM (en señalización de *checkpoints*, en reparación de ADN y en activación de p53) en su ausencia fosforilando sus sustratos (Tomimatsu et al. 2009; Callén et al. 2009). Esta interconexión implica que las tres quinasas cooperan para tener una DDR de máxima intensidad y asegurar la integridad genómica.

### 1.3 Cuestiones sin resolver en la señalización del daño por ATM y ATR

#### ¿Compiten ATM y ATR por los DSB generados por replicación?

En contraste con el diálogo que se produce entre ATM y ATR en respuesta a radiación ionizante, la respuesta desencadenada ante estrés replicativo sigue el modelo clásico basado en que

ATM y ATR activan dos rutas de señalización independientes. A este nivel quedan todavía cuestiones sin resolver. Una de ellas proviene de la mayor carga de ATR en la cromatina observada en células tratadas con hidroximetilurea en ausencia de ATM. Este dato apunta a la posibilidad de que, si bien ATR sería la principal responsable, ambas quinasas podrían tener cierta afinidad por las zonas de ER. De este modo, la ausencia de ATM provocaría una mayor respuesta de ATR o viceversa. En línea con estos resultados, la inhibición de ATM en células de un modelo murino de Seckel generado en nuestro laboratorio que presenta niveles reducidos de ATR, incrementa el número de rupturas en zonas frágiles del genoma (Murga et al. 2009).

### **¿Cómo está definida la especificidad de ATM y ATR por sus sustratos?**

Otro hecho intrigante es la activación de Chk2 por ATM en las fases S y G2 del ciclo. Nuestros experimentos muestran que ATM activa a Chk2 en todas las fases del ciclo siempre que existe un DSB. Sin embargo, resulta curioso que Chk2 no juegue un papel obvio en los *checkpoints* en S y G2 (Fernandez-Capetillo et al. 2002) y que, además, no existan evidencias de la fosforilación de Chk2 en respuesta a ER. Más aún la activación ectópica de ATR mediante un sistema celular desarrollado por nuestro grupo basado en la expresión de TopBP1 (Toledo et al. 2008), si bien es capaz de activar ATR, esto no es suficiente para detectar ATM o Chk2 fosforilados. Una posibilidad es que ATM sea una enzima promiscua y que muchos de estos sustratos sean fosforilados en sus sitios [S/T]Q siempre que ATM esté activa, independientemente de que tenga relevancia funcional. Sin embargo, algunos sustratos como es el caso de Chk1 son estrictamente fosforilados en algunas fases del ciclo, lo que se hace a través de mediadores que median la interacción entre la quinasa y su diana (Claspin, en el caso de ATR y Chk1).

### **¿Porqué la ruta ATR → Chk1 no funciona en fase G1?**

Otro punto crucial que debemos abordar es cómo se explica que la activación de la ruta ATR→Chk1 esté restringida a células post-replicativas. En levaduras, ATR puede señalar el *checkpoint* de G1 activada por Ddc1 (Rad9 en vertebrados) (Navadgi-Patil et al. 2009). En cambio, en vertebrados, ATR puede activarse en fase G1, y aunque no fosforila a Chk1 en esta fase del ciclo, sí puede fosforilar otros sustratos como H2AX. En esta dirección, se ha descubierto muy recientemente que ante daño producido por radiación UV, en todas las fases del ciclo celular, ATR es necesaria para la generación de estructuras intermediarias que serán reparadas por NER (Marteijn et al. 2009). En nuestro trabajo, evaluamos la activación de Chk1 por ATR a lo largo del ciclo mediante el desarrollo de una técnica de citometría de flujo y demostramos que la actividad de ATR no es uniforme a lo largo del ciclo. Al contrario, la fosforilación de Chk1 comienza a detectarse en fase S y alcanza su máximo al final de G2. Una posibilidad que explicaría porqué esta ruta no se activa en G1 es que alguno de sus componentes no se exprese en esa fase del ciclo, lo que ocurre con TopBP1. Consistente con esta idea, se ha observado que ATR no se expresa en

linfocitos no replicativos (Jones et al. 2004). Sin embargo, esto parece estar limitado a células que se encuentran en G0 puesto que sí están presentes ATR, Chk1, RPA y ATRIP en células en G1. Otra posibilidad es que alguna de estas proteínas requiera una pre-activación. En este sentido, observamos como a la ausencia de actividad de ATR en G1 le seguía un aumento progresivo a lo largo de la fase S hasta alcanzar un máximo de actividad en G2, dinámica que recuerda a la actividad de quinasas dependientes de ciclinas. En levaduras (Ira et al. 2004) y en células humanas (Esashi et al. 2005) existen evidencias de que la actividad Cdk coordina el ensamblaje de complejos de reparación en las distintas fases del ciclo celular. En el estudio de la respuesta a daño en el ADN, estamos acostumbrados a investigar cómo las actividades de ATM y ATR convergen finalmente en el silenciamiento de la actividad Cdk. Podría haber llegado el momento de considerar el fenómeno inverso: cómo las Cdk controlan la especificidad de las rutas de señalización del daño en el ADN a lo largo del ciclo. Se propuso a Cdk1 o Cdk2, ambas con papeles en reparación del ADN, como posibles reguladoras de la actividad de ATR. Sin embargo, en un trabajo en el que he participado, se ha demostrado que son los niveles globales de actividad Cdk, y no una Cdk específica, los que regulan la DDR (Cerqueira et al. 2009).

En realidad, la elección de la ruta de señalización puede considerarse secundaria a la elección del mecanismo por el cual la célula quiere reparar el daño en cada fase del ciclo. Trabajos posteriores realizados en levaduras y en células humanas han demostrado que solo se produce la resección del ADN durante las fases S y G2. La inhibición de los mecanismos de resección que generan ssDNA en G1 podría verse como la garantía de la célula para prevenir que el mecanismo de activación de ATR se dispare. De hecho, la principal función de la resección es procesar un DSB para que sea reparado por HR (Yata et al. 2009). Para la recombinación homóloga resulta esencial generar la longitud necesaria de ssDNA que permita invadir la cromátida hermana y establecer suficiente homología. En G1 la recombinación homóloga es inservible y podría ser fuente de translocaciones. Por lo tanto, la no activación de ATR en G1 puede considerarse no como un fin sino como un medio de evitar la HR en G1. Basándose en el descubrimiento de que la sola interacción física con un fragmento de TopBP1, llamado TAD, es suficiente para activar catalíticamente a ATR *in vitro* (Kumagai et al. 2006), Toledo et al. demostraron por expresión de TAD en células de mamífero, que ATR podía ser activada en ausencia de daño en el ADN en todas las fases del ciclo (Toledo et al. 2008). Esta activación además era suficiente para que ATR pudiese alcanzar físicamente sus sustratos y activar la DDR. Así, ATR estaría siempre dispuesta a ser activada en el momento en que sus reclutadores la pongan en funcionamiento, lo que ocurre únicamente en S y G2 (Huertas et al. 2009). Entre los principales mediadores y adaptadores de ATR/ATRIP únicamente Claspin tiene una estricta regulación dependiente de ciclo. Por esta razón, la capacidad de ATR para fosforilar a Chk1 está igualmente restringida a S y G2 paralelamente a la

expresión de Claspin, que es rápidamente degradada por una ubiquitin ligasa al comienzo de mitosis.

En resumen, la regulación precisa de la actividad de ATR en el ciclo puede ser el resultado de la contribución de Rad9, TopBP1 y Cdks, aunque no pueden descartarse otros mecanismos que queden por descubrir. La razón por la que, en contra de lo que sucede con Chk2, la evolución haya seleccionado mecanismos para que la fosforilación de Chk1 no pueda ocurrir en G1 permanece sin responder.

## 2. Papel de la compactación de la cromatina en la DDR

### 2.1 Las células no responden con igual intensidad ante el daño generado en su ADN.

Durante el desarrollo de esta Tesis hemos hecho amplio uso de la microscopía de alto rendimiento que, en contraste con la técnica de *Western blot*, nos permite evaluar la magnitud de la DDR en cada célula. Tras la exposición a una única dosis de radiación ionizante hemos observado que la cantidad de  $\gamma$ -H2AX inducido en las células de la misma población celular era muy variable. Este método, además de aportar una medida indirecta de la activación de la DDR por la intensidad de  $\gamma$ -H2AX, nos permite cuantificar el número de focos de 53BP1 que se forman tras la generación de DSB. En ambos casos, constatamos que dentro de la misma población hay grandes diferencias en la intensidad de activación de la DDR. ¿Qué provoca esta variabilidad intercelular? El hecho de que varios de los componentes de la DDR tengan su expresión regulada a lo largo del ciclo, como es el caso de TopBP1, Chk1, Brca1 o H2AX, podría explicar en parte las diferencias observadas (Yagi et al. 1995; Yoshida et al. 2004; Carrassa et al. 2003; Wang et al. 2000). Sin embargo, la señalización y la reparación de las rupturas, como otros procesos metabólicos que tienen como molde el ADN, pueden estar influenciadas por la configuración pre-existente de la cromatina, donde se genera el DSB. Varios estudios apoyan esta idea. Por un lado, la reparación de los DSB está influenciada por su localización en el núcleo (Therizols et al. 2006; Torres Rosell et al. 2007) y en los cromosomas (Goldman et al. 1996). Aunque algunos datos sugieren que los factores de reparación presentan una distribución no uniforme en el núcleo (Torres Rosell et al. 2007), nos inclinamos a pensar que es la distribución desigual de marcas epigenéticas en la cromatina la que explicaría las diferencias en la eficiencia de reparación en zonas distintas del núcleo. De acuerdo con esta idea, se ha observado que la reparación de los DSB está impedida en las regiones subteloméricas y en la periferia nuclear, caracterizadas por presentar una cromatina más compacta (Blasco 2007). Además de existir dominios de cromatina muy diversos dentro del mismo núcleo, entre células también existen diferencias en cuanto al grado de compactación global de su cromatina. Por ejemplo, se ha demostrado que durante el proceso de diferenciación de las células

madre embrionarias hacia las distintas estirpes celulares, se produce una disminución en la accesibilidad de la cromatina (Meshorer et al. 2006), seguramente debido a que se reprime mediante compactación la expresión de muchos genes exclusivos del estado “stem”. Si este estado abierto de la cromatina puede explicar el hecho de que las células madre tengan una DDR más robusta que las células diferenciadas es una pregunta que nos interesa y que se tratará de responder en un futuro. Además, y tal y como observamos al evaluar los niveles de H3 metilado por microscopía de alto rendimiento, también existen diferencias en la configuración de la cromatina entre células del mismo tipo. Estas evidencias y nuestra demostración de que la actividad de ATR ante RI está regulada por ATM a nivel de la cromatina, nos llevó a preguntarnos si la configuración de la cromatina podría modular la DDR.

## 2.2 La compactación de la cromatina limita la señalización de los DSB

La reducción de H1 genera un efecto visible en la disminución de la compactación de la cromatina acompañado de muy pocos cambios en la expresión génica (Fan et al. 2005). Basándonos en esto, en esta Tesis analizamos el comportamiento de células madre embrionarias murinas que carecen de 3 de las 6 isoformas de la histona H1 para evaluar si cambios globales en la compactación de la cromatina afectan a diferentes aspectos de la DDR: acceso, señalización y reparación (Murga et al. 2007). El efecto en el acceso de los factores a las rupturas se mostró claro: en células con la cromatina abierta los focos de 53BP1 tras una irradiación se forman más temprano, debido a que los factores acuden más rápido a las rupturas. Curiosamente, esto produce un fenotipo más pronunciado en la señalización de los DSB que en su reparación. El acceso facilitado a las rupturas incrementa la señalización de cada DSB y las células responden de forma más robusta con *checkpoints* que son activados por dosis de daño menores de lo habitual. Sin embargo, el efecto de abrir la cromatina es menos pronunciado en la reparación. De hecho, también en levadura se había observado anteriormente que bajos niveles de histona *linker* producían un efecto moderado en la reparación por recombinación homóloga (Downs et al. 2003). La disminución de histona *linker* confiere tanto a levaduras como a células de ratón, una mayor resistencia a los DSB. En levaduras, esta mayor DDR se traduce en un alargamiento de la vida. No obstante, debido a que la disminución de H1 es letal en ratón durante el desarrollo embrionario, no pudimos evaluar si una conformación abierta de la cromatina confiere protección ante cáncer o envejecimiento. Para esto habrá que esperar al estudio de los ratones generados por eliminación de la proteína compactadora L3MBTL1.

### 2.3 El efecto cromATRina

Al generar DSB en células H1<sup>50</sup> y analizar la DDR, observamos un impacto preferencial en la ruta ATR/Chk1 más que en ATM/Chk2. Nuestros resultados muestran que la hipersensibilidad para establecer los *checkpoints* en células mutantes para H1 es debida a un aumento de la señalización por la vía de ATR, mientras que la vía de ATM no muestra cambios. En el tratamiento del cáncer, se emplean inhibidores de histonas desacetilasas (HDACs) combinados con agentes genotóxicos porque han mostrado mayor eficacia al inducir en mayor medida la apoptosis. Pensamos que los inhibidores de HDACs pueden potenciar la respuesta a agentes genotóxicos al inducir la relajación de la cromatina, y sensibilizar así a las células para la DDR. Hay que añadir, que tanto en levaduras como en células de ratón, uno de los efectos de la disminución de la compactación de la cromatina es el incremento de la recombinación homóloga, reparación que es estimulada por ATR o por su quinasa diana Chk1. La preferencia de la ruta de ATR sobre la de ATM podría ser un reflejo de las necesidades de procesamiento de la cromatina que presentan ambas quinasas para su activación. Así, mientras que ATM se activa por unión con Nbs1 en los DSB (Falck et al. 2005) y por lo tanto por interacción directa proteína-proteína, ATR requiere el procesamiento de las rupturas de doble cadena para la generación de fragmentos de cadena simple (Zou and Elledge 2003). Dado que la señalización por ATR requiere un mayor procesamiento de las lesiones, es posible por lo tanto, que esto explique porqué la compactación de la cromatina limita principalmente a la señalización por ATR y a la recombinación homóloga.

### 2.4 Mayor accesibilidad de la cromatina en respuesta a DSB

La relajación de la cromatina facilita el acceso de los factores a los DSB y mejora la DDR, por esta razón no resulta extraño que hasta hoy prácticamente la totalidad de los estudios acerca de la DDR y remodelación de la cromatina sostengan que durante la respuesta a los DSB se produce una abertura de la cromatina que rodea la lesión. Existen demostraciones físicas directas de una relajación de la cromatina alrededor del DSB (Kruhlak et al. 2006a; Kruhlak et al. 2006b). Por añadidura, un estudio genético con mutantes para Trrap (cofactor de la acetiltransferasa Tip60) muestra que éstos presentan una mayor sensibilidad a los DSB y menor recombinación homóloga, efecto que se revierte con el tratamiento con un inhibidor de HDAC (Murr et al. 2006). También se ha evidenciado que mutaciones en los remodeladores de cromatina INO80 y SWI/SNF generan problemas en la señalización y reparación de las rupturas (van Attikum et al. 2005; Park et al. 2006).

Sin embargo no solo la cromatina que rodea la lesión sufre cambios durante la DDR, otras evidencias apuntan a que el efecto de relajación de cromatina es pan-nuclear. Esta idea surgió hace más de 20 años cuando se observó el ADN por microscopía electrónica tras el tratamiento con UV



(Harris et al. 1974). Este trabajo demostró además que la reparación del ADN después de su exposición a luz UV o carcinógenos era menos eficiente en regiones heterocromáticas en comparación con regiones menos compactadas. La idea ha retomado valor tras el trabajo realizado por el laboratorio de Y.Shiloh que otorga a KAP-1, efector de ATM, una función en la organización de la cromatina tras la generación de un DSB (Ziv et al 2006). Descubrieron que ATM fosforila a KAP-1 en los DSB y la forma fosforilada de KAP-1 migra rápidamente a lo largo de la cromatina promoviendo su relajación. Otro trabajo ha demostrado que el tratamiento con radiación UV genera una relajación de la cromatina que se ha mostrado dependiente de p53. Finalmente, un reciente trabajo también mostró que la proteína HP1 pierde afinidad por la cromatina una vez ésta ha sido dañada (Ayoub et al. 2008). En resumen, independientemente de que la estructura pre-existente de la cromatina sea capaz de afectar a la DDR, también parece que a propia DDR es capaz de promover la relajación de la cromatina como un mecanismo para facilitar su propio trabajo.

### 3. Desarrollo de sistemas para demostrar *in vivo* el papel de la compactación de la cromatina

#### 3.1 Elección de L3MBTL1 para estudiar la compactación de la cromatina *in vivo*

La reducción en los niveles de H1 había mostrado ser un sistema que disminuía la compactación de la cromatina. Sin embargo, en nuestro deseo de estudiar el papel de la compactación de la cromatina *in vivo*, resultaba imposible emplear esta estrategia. Existen 6 genes somáticos que expresan diferentes isoformas de H1, la eliminación de las tres isoformas H1c, H1d, H1e de H1 había resultado ser letal a nivel embrionario mientras que la eliminación de una o dos de ellas no afectaba al fenotipo de los ratones (Fan et al. 2001; Fan et al. 2003; Fan et al. 2005). Tuvimos que pensar en otras posibilidades para la generación de un modelo animal. Una posibilidad era eliminar una marca epigenética de compactación de cromatina, no obstante ninguna modificación de histonas ha mostrado tener un papel en la compactación “global” de la cromatina. La dificultad residía en que, a pesar de décadas de investigación sobre la cromatina, se conoce muy poco acerca de la estructura superior de la cromatina más allá de la fibra de 30 nm. Se han descubierto numerosos factores que afectan a la cromatina, pero pocos de ellos se han mostrado involucrados en su compactación, y de muy pocos se conoce el mecanismo. Un ejemplo es el complejo represor policomb 1 (PRC1 o Polycomb Repressive Complex 1) que compacta oligonucleosomas *in vitro*. Si pensamos en proteínas que se unen a histonas metiladas como posibles compactadores, HP1 sería un candidato. HP1 y la marca H3K9me3 están estrechamente relacionados con la represión de heterocromatina (James et al. 1986; Eisenberg et al. 2000; Maison

et al. 2004; Grewal et al. 2007; Nakayama et al. 2001), aunque no se ha probado que esta represión derive de la compactación de la cromatina.

En 2007 se publicó un trabajo que demostraba que la proteína L3MBTL1 tenía una función compactadora de la cromatina *in vitro*, a través de sus dominios MBT, que dependía únicamente de la presencia de las marcas epigenéticas H4K20me1 y H1bK26me1/2 en la cromatina. Al ser L3MBTL1 la única proteína con una función compactadora de la cromatina *per se* que se conocía, decidimos que su eliminación podía esclarecer el papel de la compactación global de la cromatina en la DDR. Además de su posible función en la regulación de la DDR, L3MBTL1 es un gen interesante con un posible papel en el desarrollo de cáncer. En el mismo trabajo se demostró que regula genes E2F y myc (implicados en proliferación y cuya desregulación se ha relacionado con desarrollo de cáncer) y que se une a la proteína Rb (gen supresor de tumores), y años atrás se había definido como un gen supresor de tumores en *Drosophila* (Gateff et al. 1993).

En esta Tesis se han desarrollado diferentes modelos experimentales de falta de función de L3MBTL1 para evaluar el papel de la compactación *in vivo*. Se disminuyó la expresión de L3MBTL1 humana con el empleo de shARN en células BJ (primarias) y en células HeLa. Al mismo tiempo desarrollamos un modelo animal de pérdida condicional de la proteína a partir del cual generamos células madre embrionarias y linfocitos B *knock-out* condicionales para L3MBTL1. Pese a la utilización de diferentes tratamientos experimentales, no se han comprobado los resultados *in vitro* que proponían una función compactadora global de la cromatina para L3MBTL1.

Conviene recordar que el efecto compactador de L3MBTL1 se ha demostrado en oligonucleosomas *in vitro* lo que no implica necesariamente que L3MBTL1 pueda compactar globalmente la cromatina. L3MBTL1 podría compactar ciertas regiones de la cromatina en las que existe un entorno cromatínico preciso y así regular la expresión de algunos genes. El hecho de que L3MBTL1 se una a modificaciones de histonas concretas ya hace que su función esté sometida a cierta regulación en la célula. Si además tenemos en cuenta el espacio internucleosomal, la presencia de RNAs no codificantes y la posición subnuclear de una región genómica dada, la especificidad de unión de L3MBTL1 en la cromatina podría ser mayor *in vivo*. Por otra parte, el análisis estructural de la proteína sugiere que cada dominio MBT permitiría la unión de un ligando (Li et al. 2007; Min et al. 2007), aunque falta investigar qué ligandos reconocerían el primero y el tercer MBT. En el modelo estructural propuesto se observó además, que los tres dominios MBT forman una estructura triangular con una cavidad central que podría albergar otro ligando desconocido (Wang et al. 2003). En resumen, si consideramos la posibilidad de que las proteínas con dominios MBT son una nueva familia de potentes compactadores de la cromatina, podemos pensar que su expresión estará estrictamente regulada o que su reclutamiento a la cromatina va a

estar controlado, al menos por la presencia limitada en el tiempo y a lo largo de la cromatina, de las marcas de metilación específicas de histonas a las que se unen.

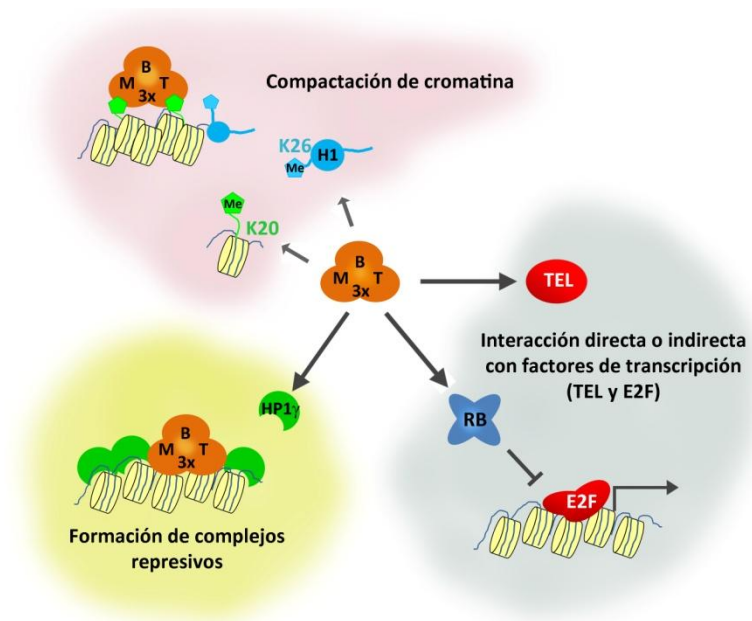
### 3.2 L3MBTL1 es un regulador de la transcripción

Existen evidencias, que colocan a la proteína como regulador transcripcional con un papel clave en la proliferación y por extensión en cáncer. Por una parte, se ha mostrado que L3MBTL1 se une a los promotores de aquellos genes que regula transcripcionalmente. En *Drosophila*, los homólogos de Rb y L3MBTL1 co-purifican con E2F y afectan a la expresión de sus genes diana (Lewis et al. 2004; Georlette et al. 2007). Esto fue más tarde corroborado con resultados de rastreo con ARN interferente de posibles reguladores de E2F (Lu et al. 2007). Los experimentos *in vitro* con L3MBTL1 humana revelaron que L3MBTL1 se une a Rb y ocupa promotores de los genes diana de E2F disminuyendo su transcripción (Trojer et al. 2007). Sin embargo, los *microarrays* realizados en células humanas BJ y en células B murinas presentados en esta Tesis no mostraron cambios significativos en la expresión de genes diana de E2F al deplecionar L3MBTL1. Tampoco observamos una regulación de los niveles de c-myc tal y como se había presentado en el trabajo de Trojer y colaboradores (Trojer et al. 2007). En cualquier caso, lo que si parece claro es que la función de L3MBTL1 en la transcripción está asociada a su unión a zonas específicas ricas en marcas tales como H4K20me1.

La mera unión a los promotores de algunos genes no explica como L3MBTL1 puede reprimir su transcripción por lo que proponemos varias hipótesis (figura 42). Alternativamente, L3MBTL1 puede regular la transcripción génica interaccionando con factores de transcripción como TEL, perteneciente a la familia de factores de transcripción ETS, a través de sus dominios SAM-SPM (Boccuni et al. 2003). No se sabe qué circunstancias permiten esta interacción, pero está claro que la asociación tiene función represora y está restringida a secuencias específicas de ADN.

Por otra parte, en la proteína humana, los dominios MBT son necesarios para la función represora de la cromatina cuando el sistema de reclutamiento endógeno es evitado artificialmente (Boccuni et al. 2003). El experimento se realizó mediante la unión de L3MBTL1 a un promotor por fusión al dominio GAL4 de unión al ADN. Esto sugiere que el reconocimiento de marcas epigenéticas no solo es una señal de reclutamiento sino que está directamente involucrado en el mecanismo de represión. Es consistente con el hecho de que L3MBTL1 compacta la cromatina *in vitro* mediante el reconocimiento de las marcas H4K20me1 y H1bK26me1/2 en nucleosomas diferentes (Trojer et al. 2007). En este caso L3MBTL1 compactaría a través del reconocimiento de marcas en las histonas y esto disminuiría la accesibilidad de la maquinaria de transcripción al ADN.

Finalmente, L3MBTL1 podría reprimir la transcripción indirectamente reclutando otros complejos represivos. Los experimentos de inmunoprecipitación realizados con L3MBTL1 humana sugieren que L3MBTL1 estaría formando un complejo con HP1 $\gamma$  (Trojer et al. 2007), normalmente asociada a regiones reprimidas de la cromatina. Un complejo de estas características permitiría el reconocimiento simultáneo de las dos marcas epigenéticas H3K9me2/3 y H4K20me1 y podría establecer heterocromatina facultativa en un entorno eucromático.



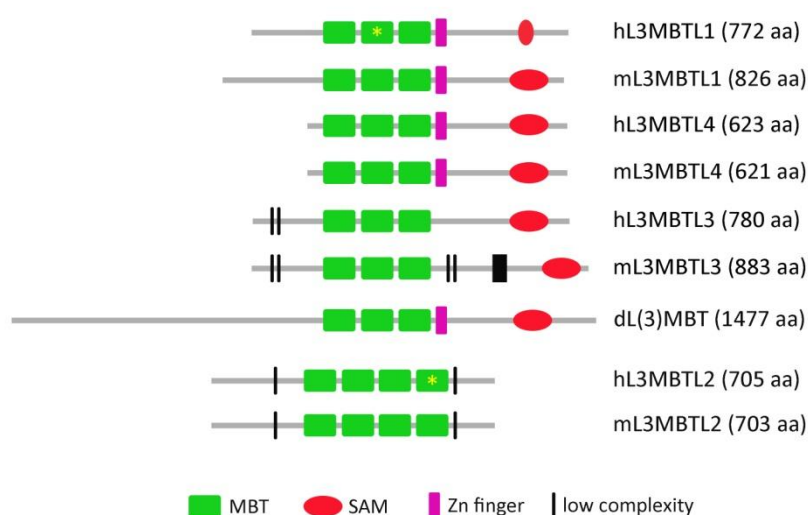
**Figura 42: Esquema de los posibles mecanismos de represión transcripcional por L3MBTL1.**  
(adaptado de Trojer et al. 2008)

### 3.3 Importancia de L3MBTL1 en ciclo celular

L3MBTL1 es esencial para la progresión del ciclo celular en células humanas primarias BJ donde su ausencia provocó la detención de la proliferación tanto en G1 como en G2 y una morfología senescente. Células HeLa deficientes en L3MBTL1, en cambio, no presentaron problemas proliferativos aunque sí problemas durante mitosis en el correcto alineamiento de los cromosomas en la placa metafásica y en la orientación de su segregación. Estos resultados son similares a los encontrados en células deplecionadas en PR-Set7, donde la pérdida de H4K20me1 es responsable de una parada en proliferación que no se daba en células HeLa (Huen et al. 2008). En cualquier caso, si bien la pérdida de PR-Set7 conlleva una acumulación de daño replicativo y arresto en S/G2 (Rice et al. 2002), ni en células humanas ni en murinas observamos un fenómeno similar al deplecionar L3MBTL1. El análisis de un modelo de ratón *knock-out* condicional de PR-Set7 (Oda et al. 2009) confirmó los datos que se tenían de *Drosophila* acerca los requerimientos de

H4K20me1 para la progresión del ciclo celular (Karachetsev et al. 2005). La actividad de PR-Set7 se mostró indispensable para el desarrollo embrionario antes de llegar los embriones a 8 células, momento en el que seguramente se habrá agotado el ARNm o la proteína PR-Set7 de contribución materna que se degrada en cada transición G1/S y momento en el que la marca H4K20me1 se habrá diluido. Al tratarse de una histona su presencia es muy estable y solo, tras cada división celular, la marca se va perdiendo. El trabajo concluye que la falta de H4K20me1 en células madre embrionarias obtenidas de este modelo animal, es responsable de su detención del ciclo celular en G2/M y de la decondensación de los cromosomas incluso en interfase, resultados que tampoco concuerdan con nuestras observaciones en células humanas. En cualquier caso, parece claro que PR-Set7 regula funciones en el mantenimiento del genoma de células replicativas que no están mediadas por L3MBTL1.

La eliminación de L3MBTL1 en el ratón no recapitula el fenotipo observado por falta de H4K20me1. Los linfocitos B *L3MBTL1 knock-out* mantenidos en cultivo varios días fueron analizados por citometría de flujo y presentaron una proliferación relativamente normal. Es posible que los requerimientos en H4K20me1 y en L3MBTL1 por parte de la célula sean diferentes durante mitosis. En cualquier caso, el enriquecimiento de los niveles de H4K20me1 en células ES deficientes en L3MBTL1 sugiere que de hecho, es especialmente relevante para su función *in vivo*. Alternativamente, la ausencia de un fenotipo grave puede deberse a que la falta de L3MBTL1 *in vivo* esté compensada por otras proteínas con dominios MBT (figura 43).



**Figura 43: Proteína supresora de tumores en *Drosophila* d(L)MBT y proteínas L3MBTL en humano y ratón.** Se ha representado esquemáticamente su organización en dominios. El asterisco indica el dominio MBT que se une a histonas cuando éste es conocido.

### 3.4 L3MBTL1 como gen supresor tumoral

Ya se ha mencionado que *l(3)mbt* es un gen supresor de tumores en *Drosophila* (Gateff et al. 1993). Los mutantes desarrollan un crecimiento neoplásico con 100% de penetrancia en el cerebro durante el desarrollo larvario y mueren sin llegar al estadio adulto. Sin embargo, el cerebro no es el único tejido afectado; los discos imaginales también presentan hiperplasia aunque en este caso no maligna ya que las células transformadas no dan lugar a tumores cuando son transplantadas. Puesto que prácticamente toda la larva de *Drosophila* está compuesta por células post-mitóticas o endomitóticas, solo un restringido grupo de células y tejidos se encuentran en proliferación y son susceptibles de transformación neoplásica: los neuroblastos ópticos adultos y las células madres del ganglio en el cerebro larvario, los discos imaginales, las gónadas y las células sanguíneas. Esto significa que la transformación neoplásica en los mutantes para *l(3)mbt* se encuentra restringida a cerebro no porque la proteína pueda tener una función particular en este órgano sino porque muchos otros órganos en la mosca no son susceptibles de transformación. Por este motivo es necesario evaluar en los ratones *knock-out* el estado de aquellos órganos donde existe proliferación activa como ovarios, testículos, intestino y bazo, mientras que podríamos no observar un fenotipo tumoral en los modelos específicos de cerebro Nex-Cre. L3MBTL1<sup>ΔΔ</sup> y Nestin-Cre. L3MBTL1<sup>ΔΔ</sup>. En cualquier caso, aunque se desconocen los niveles de expresión en ratón, en humano L3MBTL1 está altamente expresado en cerebro, lo que justifica el modelo.

Los estudios de regulación transcripcional realizados con *microarrays* en células humanas BJ revelaron que L3MBTL1 reprime la transcripción de RUNX1, cuya expresión aumenta 4.3 veces en ausencia de L3MBTL1. Este gen también es denominado AML-1 (Acute Myeloid Leukemia-1) al descubrirse como el oncogén implicado en el desarrollo de la leucemia mieloide aguda en el ser humano. Un trabajo reciente demuestra que L3MBTL1 se une al promotor de RUNX1 manteniendo reprimida su transcripción y el estado indiferenciado de megacariocitos de una forma dependiente de las marcas epigenéticas H4K20me1 y H3K9me1 (Sims et al. 2008). Este mecanismo podría explicar parte de la etiología de la leucemia mieloide aguda en algunos pacientes ya que entre éstos es común la delección de una región cromosómica que contiene el gen L3MBTL1 (Bench et al. 2004, Li et al. 2004, MacGrogan et al. 2004), lo que impediría la represión de AML-1. Sin embargo, resulta difícil pensar que los ratones *knock-out* de L3MBTL1 puedan desarrollar este tipo de leucemia ya que L3MBTL1 no parece regular la transcripción génica de AML-1 según los resultados de *microarrays* realizados en linfocitos B.

En general, los dos modelos deficientes en L3MBTL1 empleados en la Tesis: células humanas infectadas con shARN y el modelo genético *knock-out* para L3MBTL1 presentan grandes diferencias fenotípicas. Mientras que las células humanas BJ detienen su progresión en el ciclo celular en ausencia de L3MBTL1, el fenotipo es menos grave en el modelo animal donde hasta ahora no se han visto implicaciones en el desarrollo ni grandes diferencias en transcripción génica

en ausencia de L3MBTL1. Podría ser que los shARN inhiban otras L3MBT, las mismas que en ratón podrían compensar la falta de L3MBTL1.

### 3.5 L3MBTL1: ¿compactador global o local?

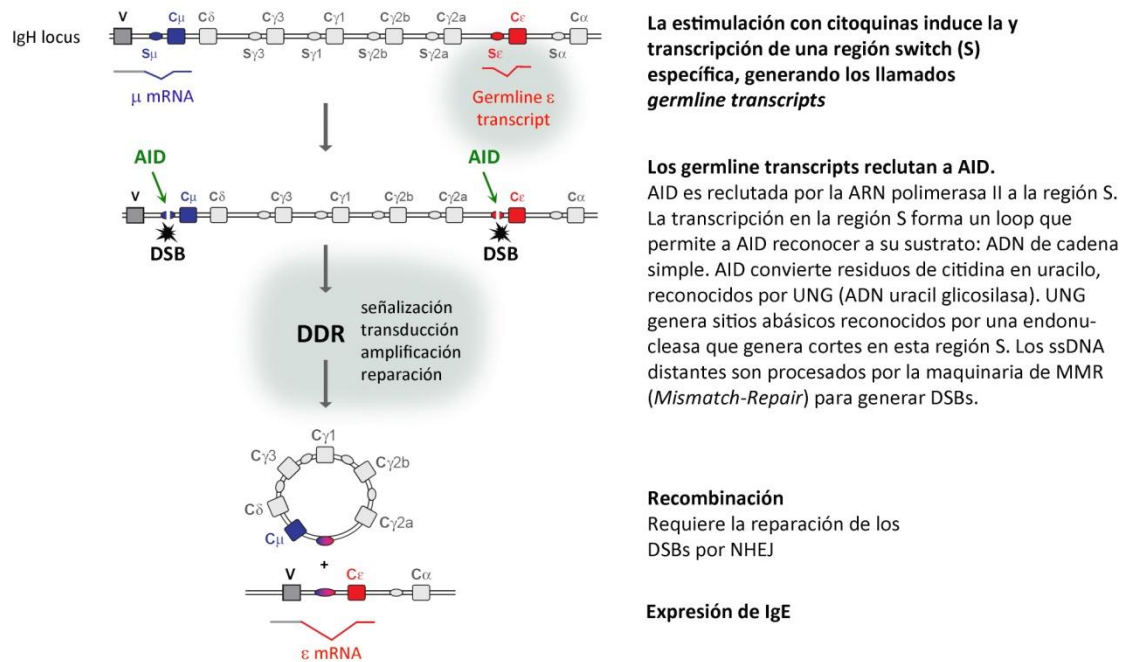
Con la eliminación de L3MBTL1 pretendíamos trasladar *in vivo* la demostración de que una configuración abierta de la cromatina mejora la DDR. Los estudios en células humanas previos a la obtención del modelo animal mostraron que la falta de L3MBTL1 no afecta a la intensidad de la señalización de los DSB ni a la cinética de reparación de éstos. La eliminación genética de L3MBTL1 en células madre embrionarias y en linfocitos B tampoco produjo efecto en la magnitud de la DDR. Contrariamente a lo que esperábamos, el acceso a la cromatina de los factores de la DDR no pareció facilitado en ausencia de L3MBTL1. Pese a que hasta el momento no hemos podido evaluar el efecto compactador de L3MBTL1 *in vivo*, estos datos sugieren de nuevo que la función compactadora de L3MBTL1 observada *in vitro* puede no ser global en el genoma celular. En la célula, la función compactadora podría estar regulada y restringida a regiones genómicas concretas que serían transcripcionalmente reguladas por L3MBTL1.

El estudio de la DDR en células B *knock-out* para L3MBTL1 presenta una gran incongruencia; mientras que la señalización de los DSB, medida por la formación de focos de 53BP1, no parece afectada por la falta de L3MBTL1, las células B *knock-out* responden más eficientemente a los DSB con mayores niveles de CSR. La evaluación de CSR en linfocitos resulta una medida de la respuesta a daño en el ADN porque durante el proceso se generan rupturas de doble cadena en el *locus* IgH que son señalizadas y reparadas para posibilitar la transcripción de un isotipo de inmunoglobulina determinado entre los 5 genes posibles. Los linfocitos L3MBTL1 *knock-out* mostraron en nuestros experimentos mayor CSR que linfocitos silvestres. El efecto en CSR parece ser general para cualquier estímulo e inmunoglobulina puesto que se observó tanto bajo la estimulación con LPS e IL4 para la producción de IgG1 como en presencia de LPS para la producción de IgG3. En grandes rasgos, la mayor tasa de CSR podría estar causada por la generación de un mayor número de rupturas en el *locus* de IgH, o por una mayor señalización de cada ruptura, que conduciría a una reparación más temprana y a mayores niveles de Ig transcurrido un tiempo determinado de estimulación (figura 44).

Por una parte, el número de rupturas en el *locus* de IgH es proporcional a los niveles de enzima que las genera, AID (Muramatsu et al. 2000). AID es reclutada a la región génica donde se producirá el corte, por transcritos de ARN específicos de la región (Manis et al. 2002). Mayores niveles de AID causarían un aumento del CSR. No es el caso de los linfocitos L3MBTL1<sup>ΔΔ</sup> ya que el análisis estadístico de los datos de *microarray* reveló que los niveles de expresión de AID eran



similares a los linfocitos control (L3MBTL1<sup>lox/lox</sup>). Un aumento en la expresión de los transcritos específicos de secuencia (*germline transcripts*) que reclutan a AID al *locus* IgH haría a AID más eficiente en su función provocando una mayor tasa de CSR. El análisis por RT-PCR de su expresión en linfocitos L3MBTL1<sup>lox/lox</sup> y L3MBTL1<sup>Δ/Δ</sup> es necesario para averiguar si L3MBTL1 regula su transcripción (figura 44).



**Figura 44: Diagrama de CSR e hipótesis de regulación por L3MBTL1.** L3MBTL1 puede regular la transcripción de los *germline transcripts* que reclutan a AID a la región S. Alternativamente, L3MBTL1 puede ser compactador local de este locus enriquecido en H4K20me1. En este caso, la falta de L3MBTL1 permitiría a esta región cromatínica adoptar una configuración más abierta, lo que facilitaría la DDR y la eficiencia de CSR (adaptado de Kaminski et al. 2004).

Otra posible explicación al aumento de CSR en ausencia de L3MBTL1 es que cada ruptura se señalice mejor por la maquinaria de la DDR. Sabemos que esto es posible en un contexto de cromatina “abierta”. Por lo tanto, esta es la primera evidencia que sugiere un papel compactador de L3MBTL1 *in vivo*. Sin embargo habría que investigar si este papel es global en la cromatina o específico de algunos *locus*, en este caso IgH. De forma indirecta, el efecto global se puede analizar con la medición del tamaño de los focos de 53BP1 en linfocitos B L3MBTL1<sup>lox/lox</sup> y linfocitos B L3MBTL1<sup>Δ/Δ</sup> por inmunofluorescencia tras la generación de daño con RI. Este experimento nos indicaría si hay un mayor acceso de los factores de la DDR a las rupturas. La compactación global se puede medir directamente mediante la tinción por FISH de un cromosoma cualquiera en linfocitos en interfase. Este experimento (llamado *chromosome painting*) permite evaluar por microscopía confocal el volumen de dicho cromosoma y por tanto su compactación. Alternativamente, L3MBTL1 puede actuar como un compactador de cromatina específico en



ciertas regiones del genoma siendo una de ellas el *locus* IgH (figura 44). Esta posibilidad se evaluará en el futuro mediante dos técnicas diferentes. La técnica de inmunoFISH permite determinar la señal de la DDR en el *locus* de IgH utilizando una sonda para el *locus* y anticuerpo anti- $\gamma$ H2AX para determinar el tamaño del foco. Por otra parte se puede realizar un FISH con 3 sondas que reconocen regiones separadas del *locus* y marcadas con fluorescencia, la distancia entre las señales fluorescentes es posteriormente medida por microscopía y es una medida directa de la compactación. Este tipo de experimentos son los que se van a abordar en un futuro próximo.

Por último, creemos especialmente relevante el hecho de que los linfocitos deficientes en L3MBTL1 presenten niveles elevados de CSR, siendo éste el primer modelo en el que se encuentra este fenotipo. Datos de ChIP *sequencing* del grupo de André Nussenzweig aún no publicados evidencian que en linfocitos B murinos estimulados en cultivo para CSR, el *locus* IgH se encuentra enriquecido en H4K20me1. Aún más, la eliminación de PR-Set7 en linfocitos B también deriva en un fenotipo de CSR incrementado (Nussenzweig, comunicación personal). En resumen, nuestros resultados sugieren que si bien L3MBTL1 no parece ser un regulador global de la cromatina, la interacción entre PR-Set7, H4K20me1 y L3MBTL1 jugarían un papel clave en regular la accesibilidad de *loci* concretos como en el caso de IgH.



# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

1. Las rutas de señalización de DSB de ATM y ATR están conectadas en respuesta a radiación ionizante, de forma que ATM controla el reclutamiento de ATR a la cromatina.
2. Las células con una menor compactación de la cromatina presentan una DDR exacerbada y mayor resistencia a agentes genotóxicos.
3. La “apertura” de la cromatina facilita el acceso de los factores de la DDR a los DSB.
4. La accesibilidad de la cromatina afecta en mayor medida a la activación de la ruta de ATR que a la de ATM, potenciando la reparación por HR.
5. Los niveles de L3MBTL1, proteína compactadora de la cromatina *in vitro*, no modulan la intensidad de la DDR de manera global.
6. Los genes regulados por L3MBTL1 presentan un enriquecimiento de la marca H4K20me1 en la proximidad del sitio de inicio de transcripción.
7. L3MBTL1 no es esencial para la proliferación de células madre o linfocitos B murinos.
8. La pérdida de L3MBTL1 altera la cromatina, promoviendo un aumento en los niveles de H4K20me1.
9. La ausencia de L3MBTL1 estimula la recombinación en el locus IgH de linfocitos B, enriquecido en H4K20me1, lo que apunta a un papel local –y no global- de L3MBTL1 como compactador de la cromatina.



# **BIBLIOGRAFÍA**





## BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, R. T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15, 2177-2196.
- Andegeko, Y., Moyal, L., Mittelman, L., Tsarfaty, I., Shiloh, Y., and Rotman, G. (2001). Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 38224-30.
- Ashcroft, M., Kubbutat, M. H., and Vousden, K. H. (1999). Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* 19, 1751-8.
- Bakkenist, C. J., and Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roth, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepeley, I., Zhao, K. (2007). High resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129(4), 823-37.
- Bartek, J., Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3(5), 421-9.
- Bartek, J., Lukas, C., Lukas, J. (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(10), 792-804.
- Bartkova, J. et al. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434, 864-870.
- Bassing, C. H. et al. (2002). Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 8173-8178.
- Bench, A. J. et al. (2000). Chromosome 20 deletions in myeloid malignancies: reduction of the common deleted region, generation of a PAC/BAC contig and identification of candidate genes. *Oncogene*, 3902-3913.
- Bench, A. J., Li, J., Huntly, B. J., Delabesse, E., Fourouclas, N., Hunt, A. R., Deloukas, P., and Green, A. R. (2004). Characterization of the imprinted polycomb gene L3MBTL, a candidate 20q tumour suppressor gene, in patients with myeloid malignancies. *British Journal of Haematology* 127, 509-18.
- Benson, F., Stasiak, A., and West, S. (1994). Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA. *EMBO Journal* 13, 5764-5771.
- Bermudez, V. P., Lindsey-Boltz, L. a., Cesare, A. J., Maniwa, Y., Griffith, J. D., Hurwitz, J., and Sancar, A. (2003). Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 1633-8.
- Blasco, M. A. (2007). The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet.* 8, 299-309.
- Boccuni, P., MacGrogan, D., Scandura, J. M., and Nimer, S. D. (2003). The human L(3)MBT polycomb group protein is a transcriptional repressor and interacts physically and functionally with TEL (ETV6). *J Biol Chem* 278, 15412-20.
- Bornemann, D., Miller, E., and Simon, J. (1996). The Drosophila Polycomb group gene Sex comb on midleg (Scm) encodes a zinc finger protein with similarity to polyhomeotic protein. *Development (Cambridge, England)* 122, 1621-30.
- Braig, M. et al. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660-665.
- Brown, E. J., and Baltimore, D. (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev.* 14, 397-402.
- Brown, E. J., and Baltimore, D. (2003). Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev.* 17, 615-628.
- Callén, E. et al. (2009). Essential role for DNA-PKcs in DNA double-strand break repair and apoptosis in ATM-deficient lymphocytes. *Molecular Cell* 34, 285-97.
- Canman, C., Lim, D., Cimprich, K., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M., and Siliciano, J. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281, 1677-9.
- Carrassa, L., Brogini, M., Vikhanskaya, F., Damia, G. (2003) Characterization of the 5' flanking region of the human Chk1 gene: identification of E2F1 functional sites. *Cell Cycle* 2: 604-9.

- Carson, C. T., Schwartz, R. A., Stracker, T. H., Lilley, C. E., Lee, D. V., and Weitzman, M. D. (2003). The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *The EMBO Journal* 22, 6610-6620.
- Casellas, R. et al. (1998). Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *The EMBO Journal* 17, 2404-11.
- Celeste, A. et al. (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296, 922-7.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M. J., Pilch, D. R., Staudt, D. W., Lee, A., Bonner, R. F., Bonner, W. M., and Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat. Cell Biol.* 5, 675-679.
- Cerqueira, A., Santamaría, D., Martínez-Pastor, B., Cuadrado, M., Fernández-Capetillo, O., and Barbacid, M. (2009). Overall Cdk activity modulates the DNA damage response in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology* 187, 773-80.
- Chai, B., Huang, J., Cairns, B. R., and Laurent, B. C. (2005). Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. *Genes & Development*, 1656-1661.
- Chan, D. W., Chen, B. P., Prithivirajasingh, S., Kurimasa, A., Story, M. D., Qin, J., and Chen, D. J. (2002). Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes & Development* 16, 2333-8.
- Chen, Z. et al. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725-30.
- Chiang, G., and Abraham, R. (2004). Determination of the catalytic activities of mTOR and other members of the phosphoinositide-3-kinase-related kinase family. *Methods Mol Biol.* 281, 125-41.
- Cliby, W. a., Roberts, C. J., Cimprich, K. a., Stringer, C. M., Lamb, J. R., Schreiber, S. L., and Friend, S. H. (1998). Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. *The EMBO Journal* 17, 159-69.
- Collado, M. et al. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.
- Collis, S. J., DeWeese, T. L., Jeggo, P. a., and Parker, A. R. (2005). The life and death of DNA-PK. *Oncogene* 24, 949-61.
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S. J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 294, 1713-6.
- Cuadrado, M., Martinez-pastor, B., Murga, M., Toledo, L. I., Gutierrezmartinez, P., Lopez, E., and Fernandez-capetillo, O. (2006). ATM regulates ATR chromatin loading in response to DNA double-strand breaks. *J. Exp. Med* 203, 297-303.
- Cui, X., Yu, Y., Gupta, S., Cho, Y., Lees-miller, S. P., and Meek, K. (2005). Autophosphorylation of DNA-dependent protein kinase regulates DNA end processing and may also alter double-strand break repair pathway choice. *Society* 25, 10842-10852.
- D'Arpa, P., Beardmore, C., and Liu, L. F. (1990). Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. *Cancer Research* 50, 6919-24.
- Daniel, J. A., Pellegrini, M., Lee, J., Paull, T. T., Feigenbaum, L., and Nussenzweig, A. (2008). Multiple autophosphorylation sites are dispensable for murine ATM activation in vivo. *The Journal of Cell Biology* 183, 777-83.
- De Bont, R., and van Larebeke, N. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19, 169-185.
- Di Leonardo, a., Linke, S. P., Clarkin, K., and Wahl, G. M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes & Development* 8, 2540-2551.
- Di Micco, R. et al. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638-642.
- Donzelli, M., Draetta, G.F. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. (2003). *Embo Reports* 4(7), 671-7.
- Downs, J. A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., Kron, S. J., Jackson, S. P., and Côté, J. (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Molecular Cell* 16, 979-90.

- Downs, J. A., Kosmidou, E., Morgan, A., Jackson, S. P., Road, T. C., Kingdom, U., and Street, C. (2003). Suppression of Homologous Recombination by the. 11, 1685-1692.
- Downs, J. A., Lowndes, N. F., and Jackson, S. P. (2000). A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* 408, 1001-4.
- Drabent, B., Saftig, P., Bode, C., and Doenecke, D. (2000). Spermatogenesis proceeds normally in mice without linker histone H1t. *Histochemistry and Cell Biology* 113, 433-42.
- Dumaz, N., and Meek, D. W. (1999). Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *The EMBO Journal* 18, 7002-10.
- D'Adda Di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Zglinicki, T. V., Saretzki, G., Carter, N. P., and Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194-198.
- Eissenberg, J.C., Elgin, S.C. (2000) The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 10, 204-10.
- Esashi, F., Christ, N., Gannon, J., Liu, Y., Hunt, T., Jasin, M., and West, S. C. (2005). CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* 434, 598-604.
- Falck, J., Coates, J., and Jackson, S. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434, 605-11.
- Fan, Y., Nikitina, T., Morin-kensicki, E. M., Zhao, J., Magnuson, T. R., Woodcock, C. L., and Skoultschi, A. I. (2003). H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo. *Mol Cell Biol* 23, 4559-4572.
- Fan, Y., Nikitina, T., Zhao, J., Fleury, T. J., Bhattacharyya, R., Bouhassira, E. E., Stein, A., Woodcock, C. L., and Skoultschi, A. I. (2005). Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell* 123, 1199-212.
- Fan, Y., Sirotkin, A., Russell, R. G., Ayala, J., and Skoultschi, A. I. (2001). Individual somatic H1 subtypes are dispensable for mouse development even in mice lacking the H1o replacement subtype. *Mol Cell Biol* 21, 7933-7943.
- Fernandez-Capetillo, O., Chen, H., and Celeste, A. (2002). DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nature Cell Biology* 4, 993-998.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., and Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* 3, 959-967.
- Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S. K., Celeste, A., Romanienko, P. J., Camerini-otero, R. D., Bonner, W. M., Manova, K., Burgoyne, P., and Nussenzweig, A. (2003). H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev. Cell* 4, 497-508.
- Francis, N.J., Kingston, R.E., Woodcock, C.L. Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. (2004). *Science* 306, 1574-7.
- Gateff, E., Löffler, T., and Wismar, J. (1993). A temperature-sensitive brain tumor suppressor mutation of *Drosophila melanogaster*: developmental studies and molecular localization of the gene. *Mech Dev* 41, 15-31.
- Georlette, D., Ahn, S., Macalpine, D.M., Cheung, E., Lewis, P.W., Beall, E.L., Bell, S.P., Speed, T., Manak, J.R., Botchan, M.R. Genomic profiling and expression studies reveal both positive and negative activities for the *Drosophila* Myb MuvB/dREAM complex in proliferating cells. (2007). *Genes Dev* 21, 2880-96.
- Goebbels, S., Bormuth, I., Bode, U., Hermanson, O., Schwab, M.H., Nave, K.A. (2006). Genetic targeting of principal neurons in neocortex and hippocampus of NEX-cre mice. *Genesis* 44(12), 611-21.
- Goldman, H., and Lichten, M. (1996). The Efficiency. *In Situ*.
- Goodarzi, A. a., Noon, A. T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Löbrich, M., and Jeggo, P. a. (2008). ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Molecular cell* 31, 167-77.
- Gottlieb, T., and Jackson, S. P. (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 72, 131-142.
- Grewal, S.I., Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 8, 35-46.

- Griffith, E., Walker, S., Martin, C.A., Vagnarelli, P., Stiff, T., Vernay, B., Al Sanna, N., Saggat, A., Hamel, B., Earnshaw, W.C., Jeggo, P.A. (2008). Mutations in pericentrin cause Seckel syndrome with defective ATR-dependent DNA damage signaling. *Nat. Genet* 40, 232-236.
- Gurley, K., and Kemp, C. (2001). Synthetic lethality between mutation in Atm and DNA-PK(cs) during murine embryogenesis. *Curr. Biol.* 11, 191-194.
- Hakem, R. (2008). DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *The EMBO Journal* 27, 589-605.
- Harper, J., and Elledge, S. J. (2007). The DNA Damage Response: ten years after. *Mol. Cell* 28, 737-745.
- Harris, C.C., Connor, R.J., Jackson, F.E., Lieberman, M.W. (1974). Intranuclear distribution of DNA repair synthesis induced by chemical carcinogens or ultraviolet light in human diploid fibroblasts. *Cancer Research* 34, 3461-8.
- Hayflick, L., and Moorhead, P. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 25, 585-621.
- Hefferin, M. L., and Tomkinson, A. E. (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA repair* 4, 639-48.
- Heim, S., Mitelman, F. (1992). Cytogenetic analysis in the diagnosis of acute leukemia. *Cancer* 70, 1701-1709.
- Hiom, K. (2000). Homologous recombination. *Current biology : CB* 10, R359-61.
- Hirao, A. (2000). DNA Damage-Induced Activation of p53 by the Checkpoint Kinase Chk2. *Science* 287, 1824-1827.
- Hittelman, W., and Pollard, M. (1984). Visualization of chromatin events associated with repair of ultraviolet light-induced damage by premature chromosome condensation. *Carcinogenesis* 5.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-74.
- Horejsi, Z., Falck, J., Bakkenist, C. J., Kastan, M. B., Lukas, J., and Bartek, J. (2004). Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation. *Oncogene* 23, 3122-3127.
- Huen, M.S.Y., Sy, S. M.H., van Deursen, J.M., Chen, J. (2008). Direct interaction between Set8 and proliferating cell nuclear antigen couples H4K20 methylation with DNA replication. *J Biol Chem.* 283(17), 11073-11077.
- Huertas, P., and Jackson, S. P. (2009). Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 9558-65.
- Huyen, Y. et al. (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* 432, 406-11.
- Inomata, K. et al. (2009). Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation. *Cell* 137, 1088-99.
- Ira, G. et al. (2004). DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* 21;431(7011):1011-7.
- James, T.C., Elgin, S.C. (1986). Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol. Cell Biol.* 6, 3862-72.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G. C., Lukas, J., and Jackson, S. P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 8, 37-45.
- Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-80.
- Jiang, Y., Rabbi, M., Kim, M., Ke, C., Lee, W., Clark, R. L., Mieczkowski, P. a., and Marszalek, P. E. (2009). UVA generates pyrimidine dimers in DNA directly. *Biophysical journal* 96, 1151-8.
- Jones, G. G., Reaper, P. M., Pettitt, A. R., and Sherrington, P. D. (2004). The ATR-p53 pathway is suppressed in noncycling normal and malignant lymphocytes. *Oncogene* 23, 1911-21.
- Kaminski, D.A., Stavnezer, J. (2004). Antibody class switching: uncoupling S region accessibility from transcription. *Trends in Genetics* 28(8), 337-340.
- Karachentsev, D., Sarma, K., Reinberg, D., Steward, R. PR-Set7-dependent methylation of histone H4 Lys 20 functions in repression of gene expression and is essential for mitosis. (2005). *Genes Dev* 19, 431-5.

- Kastan, M. B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323.
- Kim, Y., Gerlitz, G., Furusawa, T., Catez, F., Nussenzweig, A., Oh, K., Kraemer, K., Shiloh, Y., and Bustin, M. (2009). Activation of ATM depends on chromatin interactions occurring before induction of DNA damage. *Nat Cell Biol.* 11, 92-6.
- Kitagawa, R., Bakkenist, C.J., McKinnon, P.J., Kastan, M.B. (2004). Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev* 18(12), 1423-38.
- Kobayashi, J., Antoccia, A., Tauchi, H., Matsuura, S., and Komatsu, K. (2004). NBS1 and its functional role in the DNA damage response. *DNA repair* 3, 855-61.
- Koga, H., Matsui, S., Hirota, T., Takebayashi, S., Okumura, K., and Saya, H. (1999). A human homolog of *Drosophila* lethal(3)malignant brain tumor (l(3)mbt) protein associates with condensed mitotic chromosomes. *Oncogene* 18, 3799-809.
- Kornberg (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-71.
- Kozlov, S. V., Graham, M. E., Peng, C., Chen, P., Robinson, P. J., and Lavin, M. F. (2006). Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *The EMBO Journal* 25, 3504-3514.
- Kruhlak, M. J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Müller, W. G., McNally, J. G., Bazett-Jones, D. P., and Nussenzweig, A. (2006a). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *The Journal of Cell Biology* 172, 823-34.
- Kruhlak, M. J., Celeste, A., and Nussenzweig, A. (2006b). Spatio-temporal dynamics of chromatin containing DNA breaks. *Cell Cycle* 5, 1910-2.
- Koga, H., Matsui, S., Hirota, T., Takebayashi, S., Okumura, K., Saya, H. (1999). A human homolog of *Drosophila* lethal(3)malignant brain tumor (l(3)mbt) protein associates with condensed chromosomes. *Oncogene* 18, 3799-3809.
- Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H. Y., and Dunphy, W. G. (2006). TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* 124, 943-55.
- Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W. H., Swanson, S. K., Glaser, R. L., Yates, J. R., Abmayr, S. M., Washburn, M. P., and Workman, J. L. (2004). Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* 306, 2084-7.
- Lavin, M. F., Birrell, G., Chen, P., Kozlov, S., Scott, S., and Gueven, N. (2005). ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage. *Mutation Research* 569, 123-32.
- Lee, J., and Paull, T. T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308, 551-4.
- Lee, J., and Paull, T. T. (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* 304, 93-6.
- Lewis, P.W., Beall, E.L., Fleischer, T.C., Georlette, D., Link, A.J., Botcham, M.R. Identification of a *Drosophila* Myb-E2F/RBF transcriptional repressor complex. (2004). *Genes Dev* 18, 2929-40.
- Li, H., Fischle, W., Wang, W., Duncan, E.M., Liang, L., Murakami-Ishibe, S., Allis, C.D., Patel, D.J. (2007). Structural basis for lower lysine methylation state-specific readout by MBT repeats of L3MBTL1 and an engineered PHD Finger. *Mol Cell* 28, 677-91.
- Li, J., Bench, A. J., Vassiliou, G. S., Fourouclas, N., Ferguson-Smith, A. C., and Green, A. R. (2004). Imprinting of the human L3MBTL gene, a polycomb family member located in a region of chromosome 20 deleted in human myeloid malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7341-6.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362.
- Liu, Q. et al. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14, 1448-1459.
- Lou Z, K., Minter-Dikhouse, S., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., Alt, F.W., Chen, J. (2006). MDC1 Maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell* 21, 187-200.
- Liu, S., Lukas, C., Bartek, J., and Lukas, J. (2006). Claspin Operates Downstream of TopBP1 To Direct ATR Signaling towards Chk1 Activation. *Molecular and Cellular Biology* 26, 6056-6064.
- Ljungman, M. (1989). Pretreatment with UV light renders the chromatin in human fibroblasts more susceptible to the DNA-damaging agents bleomycin, gamma radiation and 8-methoxypsoralen. *Carcinogenesis* 10, 447-451.

- Lovejoy, C. a., and Cortez, D. (2009). Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA Repair* 8, 1004-1008.
- Lu, J., Ruhf, M., Perrimon, N., and Leder, P. (2007). A genome-wide RNA interference screen identifies putative chromatin regulators essential for E2F repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 9381-6.
- Lukas, C. et al. (2004). Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *The EMBO Journal* 23, 2674-2683.
- Lukas, C., Falck, J., Bartkova, J., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoints regulators induced by DNA damage. *Nature Cell Biology* 5, 255-260.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: Signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair*, 997-1007.
- MacGrogan, D., Kalakonda, N., Alvarez, S., Scandura, J. M., Boccuni, P., Johansson, B., and Nimer, S. D. (2004). Structural integrity and expression of the L3MBTL gene in normal and malignant hematopoietic cells. *Genes, Chromosomes and Cancer* 41, 203-213
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., and Lukas, J. (2006). Destruction of Claspin by SCFbetaTrCP restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. *Molecular cell* 23, 307-18.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuåsen, R., Welcker, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2000). Rapid Destruction of Human Cdc25A in Response to DNA Damage. *Science* 288, 1425-1429.
- Maison, C., Almouzni, G. (2004). HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 296-304.
- Majka, J., Binz, S. K., Wold, M. S., and Burgers, P. M. (2006). Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 27855-61.
- Manis, J.P., Tian, M., Alt, F.W. (2003). Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol* 23, 31-39.
- Marteijn, J. a., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Lans, H., Schwertman, P., Gourdin, A. M., Dantuma, N. P., Lukas, J., and Vermeulen, W. (2009). Nucleotide excision repair-induced H2A ubiquitination is dependent on MDC1 and RNF8 and reveals a universal DNA damage response. *The Journal of Cell Biology* 186, 835-47.
- Martens, U. M., Chavez, E. a., Poon, S. S., Schmoor, C., and Lansdorp, P. M. (2000). Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Experimental Cell Research* 256, 291-9.
- Matsuoka, S. et al. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160-6.
- Matsuoka, S., Huang, M., and Elledge, S. (1998). Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase. *Science* 282, 1893-1897.
- Maurer-Stroh, S., Dickens, N. J., Hughes-Davies, L., Kouzarides, T., Eisenhaber, F., and Ponting, C. P. (2003). The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends in Biochemical Sciences* 28, 69-74.
- Medhurst, A. L., Warmerdam, D. O., Akerman, I., Verwayen, E. H., Kanaar, R., Smits, V. a., and Lakin, N. D. (2008). ATR and Rad17 collaborate in modulating Rad9 localisation at sites of DNA damage. *Journal of Cell Science* 121, 3933-40.
- Meshorer, E., Yellajoshula, D., George, E., Scambler, P.J., Brown, D.T., Misteli, T. (2006). Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev Cell* 10, 105-16.
- Mimitou, E. P., and Symington, L. S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* 455, 770-4.
- Min, J., Allali-Hassani, A., Nady, N., Qi, C., Ouyang, H., Liu, Y., Mackenzie, F., Vedadi, M., Arrowsmith, C.H. (2007). L3MBTL1 recognition of mono- and dimethylated histones. *Nat Struct Mol Biol* 14(12), 1229-30.
- Mirzoeva, O. K., and Petrini, J. H. (2001). DNA Damage-Dependent Nuclear Dynamics of the Mre11 Complex. *Society* 21, 281-288.
- Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-9.

- Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W., Sen, S., and Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* (New York, N.Y.) 303, 343-8.
- Mora-Bermúdez, F., Gerlich, D., Ellenberg, J. (2007). Maximal chromosome compaction occurs by axial shortening in anaphase and depends on Aurora kinase. *Nat Cell Biol* 9, 822-31.
- Morgan, D. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Biol* 13, 261-91.
- Morrison, A. J., Highland, J., Krogan, N. J., Arbel-eden, A., Greenblatt, J. F., Haber, J. E., Shen, X., Park, S., and Division, R. (2004). INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodelling to DNA damage repair. *Cell* 119, 767-775.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., Honjo, T. (2000) Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102(5), 553-63.
- Murga, M., Bunting, S., Montaña, M.F., Soria, R., Mulero, F., Cañamero, M., Lee, Y., McKinnon, P.J., Nussenzweig, A., Fernandez-Capetillo, O. (2009). A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nature Genetics* 41, 891-8.
- Murga, M., Jaco, I., Yuhong, F., Soria, R., Martinez-Pastor, B., Cuadrado, M., Yang, S.M., Blasco, M.A., Skoultschi, A.I., Fernandez-Capetillo, O. (2007). Global chromatin compaction limits the strength of the DNA damage response. *J. Cell Biol.* 178, 1101-1108.
- Murr, R., Loizou, J.I., Yang, Y.G., Cuenin, C., Wang, Z.Q., Herceg Z. (2006). Histone acetylation by Trapp-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 8, 91-9.
- Nagy, A., Moens, C., Ivanyi, E., Pawling, J., Gertsenstein, M., Hadjantonakis, Pirity, M., Rossant, J. (1998). Dissecting the role of N-muc in development using a single targeting vector generate a series of alleles. *Current boil.* 8(11), 661-666.
- Nakano, K., and Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular cell* 7, 683-94.
- Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., Grewal, S.I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292, 110-3
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., and Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-716.
- Navadgi-Patil, V. M., and Burgers, P. M. (2009). The unstructured C-terminal tail of the 9-1-1 clamp subunit Ddc1 activates Mec1/ATR via two distinct mechanisms. *Molecular Cell* 36, 743-53.
- New, J., Sugiyama, T., Zaitseva, E., and Kowalczykowski, S. (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* 391, 407-410.
- Nishioka, K. et al. (2002). PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Molecular Cell* 9, 1201-13.
- Norbury, C., and Nurse, P. (1992). *Animal Cell Cycles and Their Control*. Annual Review of Biochemistry 61, 441-468.
- Nussenzweig, A., Chen, C., Da Costa Soares, V., Sanchez, M., Sokol, K., Nussenzweig, M., and Li, G. (1996). Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* 382, 551-555.
- Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnem, C.W., Weinert, T.A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* 36, 617- 56.
- Oda, E. (2000). Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.
- Oda, H., Okamoto, I., Murphy, N., Chu, J., Price, S.M., Shen, M.M., Torres-Padilla, M.E., Heard, E., Reinberg, D. (2009). Monomethylation of histone H4-Lysine 20 is involved in chromosome structure and stability and is essential for mouse development. *Mol Cell Biol* 29(8), 2278-95.
- Osborn, A.J., Elledge, S.J., Zou, L. (2002). Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol* 12(11), 509-16.

- O'Driscoll, M., Gennery, A. R., Seidel, J., Concannon, P., and Jeggo, P. A. (2004). An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. *DNA Repair* 3, 1227-35.
- O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V. L., Woods, C. G., Jeggo, P. A., and Goodship, J. A. (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat. Genet* 33, 497-501.
- Pandita, T. K., Lieberman, H. B., Lim, D. S., Dhar, S., Zheng, W., Taya, Y., and Kastan, M. B. (2000). Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. *Oncogene* 19, 1386-1391.
- Papamichos-Chronakis, M., Krebs, J. E., and Peterson, C. L. (2006). Interplay between Ino80 and Swr1 chromatin remodeling enzymes regulates cell cycle checkpoint adaptation in response to DNA damage. *Genes & Development*, 2437-2449.
- Park, J., Park, E., Lee, H., Kim, S. J., Hur, S., Imbalzano, A. N., and Kwon, J. (2006). Mammalian SWI/SNF complexes facilitate DNA double-strand break repair by promoting gamma-H2AX induction. *The EMBO journal* 25, 3986-97.
- Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* 5, 741-747.
- Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., and Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol* 10, 886-895.
- Paulsen, R. D., and Cimprich, K. a. (2007). The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA repair* 6, 953-66.
- Pellegrini, M., Celeste, A., Lippantonio, D., S., G., R., W., F., L., and Nussenzweig, A. (2006). Autophosphorylation at serine 1987 is dispensable for murine Atm activation in vivo. *Nature* 443, 222-225.
- Perez, O., PO, K., and Nolan, G. (2004). Flow cytometric analysis of kinase signaling cascades. *Methods Mol. Biol.* 263, 67-94.
- Peterson, C. L., and Cote, J. (2004). Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev* 18, 602-616.
- Petrini, J. H., and Stracker, T. H. (2003). The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol.* 13, 458-462.
- Rabini, S., Franke, K., Saftig, P., Bode, C., Doenecke, D., and Drabent, B. (2000). Spermatogenesis in mice is not affected by histone H1.1 deficiency. *Experimental Cell Research* 255, 114-24.
- Reddy, Y. V., Ding, Q., Lees-Miller, S. P., Meek, K., and Ramsden, D. a. (2004). Non-homologous end joining requires that the DNA-PK complex undergo an autophosphorylation-dependent rearrangement at DNA ends. *The Journal of biological chemistry* 279, 39408-13.
- Rice, J.C., Nishioka, K., Sarma, K., Steward, R., Reinberg, D., Allis, C.D. (2002) Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes Dev* 16, 2225-30.
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell. Biol.* 146, 905-916.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., and Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem* 273, 5858-5868.
- Rubbi, C. P., and Milner, J. (2003). p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO J* 22, 975-986.
- Ruzankina, Y. et al. (2007). Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. *Cell Stem Cell* 1, 113-26.
- Ruzankina, Y., Asare, A., and Brown, E. J. (2008). Replicative stress, stem cells and aging. *Mech Ageing Dev.* 129, 460-466.
- Ruzankina, Y., Pinzon-Guzman, C., Asare, A., Ong, T., Pontano, L., Cotsarelis, G., Zediak, V.P., Velez, M., Bhandoola, A., Brown, E.J. (2007). Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. *Cell Stem Cell* 1, 113-126.
- Sanders, S. L., Portoso, M., Mata, J., Bahler, J., Allshire, R. C., and Kouzarides, T. (2004). Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* 119, 603-614.



- Sarkaria, J. N., Tibbetts, R. S., Busby, E. C., Kennedy, a. P., Hill, D. E., and Abraham, R. T. (1998). Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *Cancer research* 58, 4375-82.
- Savitsky, K. et al. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268, 1749-53.
- Serrano, M., Lin, A., McCurrach, M., Beach, D., and Lowe, S. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Sharpless, N., and DePinho, R. (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 703-13.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). Cdk inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501-1512.
- Sherr, C., and Roberts, J. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 18, 2699-711.
- Shieh, S. Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.* 14, 289-300.
- Shieh, S., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325-34.
- Shiloh, K., and Kastan, M. B. (2001). ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv. Cancer Res* 83, 209-54.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature reviews. Cancer* 3, 155-68.
- Shim, E. Y., Hong, S. J., Oum, J., Yanez, Y., Zhang, Y., and Lee, S. E. (2007). RSC mobilizes nucleosomes to improve accessibility of repair machinery to the damaged chromatin. *Molecular and Cellular Biology* 27, 1602-13.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J., Pazin, M. J., Davie, J. R., and Peterson, C. L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311, 844-7.
- Shroff, R., Arbel-eden, A., Pilch, D., Ira, G., Bonner, W. M., Petrini, J. H., Haber, J. E., and Lichten, M. (2004). Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr. Biol.* 14, 1703-1711.
- Sims, J. K., and Rice, J. C. (2008). PR-Set7 establishes a repressive *trans*-tail histone code that regulates differentiation. *Mol and Cell Biol* 28 (14), 4459-68.
- Sirotkin, A. M., Edelmann, W., Cheng, G., Szanto, K., A., K., R, and Skoultschi, A. I. (1995). Mice develop normally without the H1(0) linker histone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6434-6438.
- Smith, G. C., and Jackson, S. P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 13, 916-934.
- Smits, V. a., Reaper, P. M., and Jackson, S. P. (2006). Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response. *Current Biology* 16, 150-9.
- Stewart, G. S. et al. (1999). The DNA Double-Strand Break Repair Gene. 99, 577-587.
- Stewart, G. S., Wang, B., Bignell, C. R., Taylor, A. M., and Elledge, S. J. (2003). Mdc1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 961-966.
- Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Lobrich, M., and Jeggo, P. A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 64, 2390-2396.
- Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J., and Jackson, S. P. (2005). Mdc1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123, 1213-1226.
- Su, T. T. (2006). Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. *Annual Review of Genetics* 40, 187-208.
- Takahashi, K., and Kaneko, I. (1985). Changes in nuclease activity of mammalian cells after irradiation with 60Co gamma-rays. *Int.J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med* 48, 389-395.
- Takai, H. et al. (2002). Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *The EMBO Journal* 21, 5195-205.

- Takai, H., Smogorzewska, A., and Lange, T. D. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol.* 13, 1549-1556.
- Taylor, W.R., Stark, G.R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20(15), 1803-15.
- Te Poele, R., Okorokov, A., Jardine, L., Cummings, J., and Joel, S. (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 62, 1876-83.
- Therizols, P., Fairhead, C., Cabal, G. G., Genovesio, A., Olivo-Marin, J., Dujon, B., and Fabre, E. (2006). Telomere tethering at the nuclear periphery is essential for efficient DNA double strand break repair in subtelomeric region. *The Journal of Cell Biology* 172, 189-99
- Tibbetts, R. S. et al. (1999). role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* 13, 152-157.
- Todaro, G.J., Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17, 299-313.
- Toledo, L. I., Murga, M., Gutierrez-Martinez, P., Soria, R., and Fernandez-Capetillo, O. (2008). ATR signaling can drive cells into senescence in the absence of DNA breaks. *Genes & Development*, 297-302.
- Tomimatsu, N., Mukherjee, B., and Burma, S. (2009). Distinct roles of ATR and DNA-PKcs in triggering DNA damage responses in ATM-deficient cells. *EMBO Reports* 10 (6), 629-35.
- Torres Rosell, J., Sunjevaric, I., De Piccoli, G., Sacher, M., Eckert-Boulet, N., Reid, R., Jentsch, S., Rothstein, R., Aragon ,L., Lisby, M. (2007) The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus. *Nat Cell Biol* 9, 923-31.
- Trojer, P., Li, G., Sims, R.J.3<sup>rd</sup>., Vaquero, A., Kalahonda, N., Boccuni, P., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Nimer, S.D., Wang, Y.H., Reinberg, D. (2007). L3MBTL1, a histone-methylation-dependent chromatin lock. *Cell* 129, 915-928.
- Trojer, P., Reinberg, D. (2008). Beyond histone methyl-lysine binding. *Cell Cycle* 7(5), 578-585.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, PC., Bock, R., Klein, R., Schütz, G. (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet.* 23(1), 99-103.
- Tsukuda, T., Fleming, A., Nickoloff, J., and Osley, M. (2005). Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 438, 379-83.
- Turner, B. M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 22, 836-45.
- Uematsu, N. et al. (2007). Autophosphorylation of DNA-PKcs regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *The Journal of Cell Biology* 177, 219-29.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., and Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *The EMBO Journal.* 22, 5612-5621.
- Van Attikum, H., and Gasser, S. M. (2009). Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends in Cell Biology* 2, 207-217.
- Van Attikum, H., and Gasser, S. M. (2005). ATP-dependent chromatin remodeling and DNA double-strand break repair. *Cell Cycle* 4, 1011-4.
- Van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B., and Gasser, S. M. (2004). Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell* 119, 777-788.
- Walter, J., and Newport, J. (2000). Initiation of eukaryotic DNA replication: Origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase . *Mol. Cell* 5, 617-627.
- Wang, A., Schneider Broussard, R., Kumar, A.P., MacLeod, M.C., Johnson, D.G. (2000). Regulation of BRCA1 expression by the Rb-E2F pathway. *J Biol Chem* 275, 4532-6.
- Wang, W.K., Tereshko, V., Boccuni, P., MacGrogan, D., Nimer, S.D., Patel, D.J. (2003). Malignant brain tumor repeats: a three leaved propeller architecture with ligand/peptide binding pockets. *Structure (Camb)* 11, 775-89.
- Ward, I. M., Minn, K., Jorda, K. G., and Chen, J. (2003). Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 19579-82.

- Ward, I. M., Wu, X., and Chen, J. (2001). Threonine 68 of Chk2 is phosphorylated at sites of DNA strand breaks. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 47755-8.
- Welsh, P. L., Owens, K. N., and King, M. C. (2000). Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends in Genetics* 16, 69-74.
- West, S. C. (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4, 435-45.
- Willis, S. et al. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315, 856-9.
- Wismar, J., Habtemichael, N., Vef, O., Geibenl, M., Altmeyerj, W., Sass, H., and Gateff, E. (1995). *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Development* 53, 141-154.
- Xu, B., Kim, S., Lim, D., and Kastan, M. B. (2002). Two molecularly distinct G2/M checkpoints are induced by ionizing irradiation. *Society* 22, 1049-1059.
- Yagi, H., Kato, T., Nagata, T., Habu, T., Nozaki, M., Matsushiro, A., Nishimune, Y., Morita, T. (1995) Regulation of the mouse histone H2A.X gene promoter by the transcription factor E2F and CCAAT binding protein. *J Biol Chem* 270, 18759-65.
- Yamauchi, M. et al. (2008). Growth of persistent foci of DNA damage checkpoint factors is essential for amplification of G1 checkpoint signaling. *DNA repair* 7, 405-17.
- Yata, K., and Esashi, F. (2009). Dual role of CDKs in DNA repair: to be, or not to be. *DNA Repair* 8, 6-18.
- Yoshida, K., Inoue, I. (2004) Expression of MCM10 and TopBP1 is regulated by cell proliferation and UV irradiation via the E2F transcription factor. *Oncogene* 23:6250-60.
- You, Z. et al. (2009). CtIP links DNA double-strand break sensing to resection. *Molecular Cell* 36, 954-69.
- You, Z., Hunter, T., and Russell, P. (2005). ATM Activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Society* 25, 5363-5379.
- Yuan, S. S., Lee, S. Y., Chen, G., Song, M., Tomlinson, G. E., and Lee, E. Y. (1999). BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res* 59, 3547-3551.
- Zgheib, O., Pataky, K., Brugger, J., and Halazonetis, T. D. (2009). An oligomerized 53BP1 tudor domain suffices for recognition of DNA double-strand breaks. *Molecular and cellular biology* 29, 1050-8.
- Zhang, R., Chen, W., and Adams, P. D. (2007). Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Molecular and Cellular Biology* 27, 2343-58.
- Zhao, H., Watkins, J. L., and Piwnica-Worms, H. (2002). Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 14795-800.
- Zhao, H., and Piwnica-Worms, H. (2001). ATR-Mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Molecular and Cellular Biology* 21, 4129-4139.
- Ziv, Y., Bielopolski, D., Galanty, Y., Lukas, C., Taya, Y., Schultz, D.C., Lukas, J., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., Shiloh, Y. (2006). Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat Cell Biol* 8, 870-6.
- Zou, L., Liu, D., and Elledge, S. J. (2003). Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 13827-13832.
- Zou, L., and Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542-8.



## **ANEXO- PUBLICACIONES**